

На правах рукописи

Алексей Германович Крушельницкий

**Молекулярная динамика белков и
полипептидов. Исследование методом
релаксационной и обменной ЯМР-
спектроскопии.**

01.04.07 – физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени доктора физико-математических
наук**

Казань, 2006

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биофизики Казанского Института Биохимии и Биофизики Казанского Научного Центра Российской Академии Наук

Научный консультант: доктор физико-математических наук, профессор
Федотов Владимир Дмитриевич

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук, профессор
Маклаков Александр Иванович

доктор физико-математических наук, профессор
Анисимов Александр Васильевич

доктор физико-математических наук,
ведущий научный сотрудник
Кутышенко Виктор Павлович

Ведущая организация: Центр магнитной томографии и спектроскопии
Московского государственного университета им.
М.В. Ломоносова

Защита состоится 26 октября 2006 г. в 14.30 на заседании диссертационного совета Д 212.081.15 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина в аудитории 210 физического корпуса (ул. Кремлевская, 18)

Отзывы по данной работе просим отправлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский государственный университет, служба аттестации научных кадров.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при КГУ.

Автореферат разослан

сентября 2006 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

Еремин М.В.

Общая характеристика работы.

Актуальность. За последние десятилетия белки стали едва ли не самым популярным биологическим объектом, который интенсивно изучается различными физическими методами. Одна из основных целей исследования белков – изучение молекулярных механизмов их биологического функционирования. Сейчас является общепризнанным, что молекулярная динамика, наряду с пространственной структурой, является важнейшим и неотъемлемым фактором, обеспечивающим биологическую функциональность белков. Поэтому изучение молекулярных движений и физических факторов, определяющих их характеристики, является важной проблемой в современных исследованиях биополимеров.

Очень важным и не до конца исследованным является вопрос о влиянии межмолекулярных взаимодействий на динамическое поведение белков как в растворе, так и в твердом состоянии. В живой клетке белки находятся в непосредственном окружении других белков и различных (макро)молекул, а при анализе экспериментов на белках возможными эффектами межмолекулярных взаимодействий чаще всего пренебрегают. Поэтому данная проблема представляет интерес как с точки зрения методики экспериментального изучения физических свойств белков, так и с точки зрения получения корректной информации о молекулярных механизмах их биологического функционирования.

В растворе белки, как правило, имеют ненулевой суммарный электрический заряд и электрический дипольный момент порядка сотен Дебай. При концентрациях белковых растворов в несколько процентов межмолекулярные электростатические взаимодействия могут оказывать заметное влияние на характер броуновского вращения. Взаимное электростатическое ориентирование биомолекул – одно из определяющих понятий в изучении процесса "докинга", то есть "причаливания" двух белков (или белка и субстрата) друг к другу. С другой стороны, в гомогенных растворах белки чаще всего не имеют комплементарной электростатической структуры и не образуют стабильных комплексов, хотя межмолекулярные взаимодействия, безусловно, присутствуют и там. Но

систематического исследования влияния электростатических взаимодействий на характер броуновского вращения белков при различных условиях до недавнего времени не проводилось.

Другая связанная с этим проблема – влияние межмолекулярных взаимодействий в твердых белковых препаратах на параметры внутренней конформационной динамики белков. В связи с этим встает вопрос: насколько корректно применять информацию, полученную из твердотельных экспериментов, для объяснения молекулярно-биологических свойств белков, которые они проявляют в растворах? Чаще всего предполагается, что в полностью гидратированном твердом состоянии и растворе динамические свойства белков если и различаются, то незначительно. Но примеры систематического изучения этой проблемы нам не известны.

Ядерный магнитный резонанс является сейчас самым эффективным экспериментальным средством получения разнообразной информации о молекулярной подвижности белков. В то же время, одна из основных методических проблем, возникающих при исследовании молекулярной динамики методом ЯМР, состоит в том, что из эксперимента можно определить только характерное время молекулярного движения и степень усреднения этим движением того или иного типа взаимодействия магнитных ядер либо с внешним полем, либо друг с другом. Эта степень усреднения чаще всего называется параметром порядка, он играет роль амплитудного параметра в широко известном безмодельном подходе, предложенном Липари и Сзабо (Lipari & Szabo, *JACS*, 104, 4546, 1982). В подавляющем большинстве случаев параметр порядка невозможно однозначно переформулировать в понятные для описания молекулярной динамики параметры – амплитуды движения, выраженные в ангстремах или градусах, и геометрические модели. Именно это обстоятельство является основной причиной того, что очень большая доля работ по исследованию динамики биополимеров имеет качественно-сравнительный характер. Переход к конкретным физическим моделям движения до недавнего времени практически всегда был связан с привлечением либо независимых

данных, либо (чаще всего) неких априорных допущений. Поэтому разработка способов получения детальной картины молекулярной динамики непосредственно из экспериментальных данных является важной и актуальной задачей этой области науки.

Основные задачи исследования.

Основной задачей диссертации является изучение влияния межмолекулярных взаимодействий на динамическое поведение белков в растворе и в твердом состоянии и получение информации о физических моделях молекулярных движений биополимеров непосредственно из экспериментальных ЯМР-данных. Более конкретно, данная задача сводится к решению следующих взаимосвязанных проблем:

- Изучение влияния межмолекулярных электростатических взаимодействий в белковых растворах на характер броуновского вращения белков; создание качественной модели, объясняющей форму корреляционной функции вращения белков, а также ее зависимость от различных экспериментальных условий (концентрация, pH, температура, ионная сила);
- Сравнительное изучение внутренней динамики глобулярных белков в кристаллическом и аморфном (регидратированный лиофилизированный порошок) состояниях; определение степени влияния межмолекулярных контактов в твердых белковых препаратах на характеристики внутренней конформационной подвижности в широкой частотной области.
- Разработка новых методических подходов для исследования молекулярной динамики биополимеров, основанных на комплексном применении различных ЯМР экспериментов;
- Количественное исследование влияния гидратации на внутреннюю динамику биополимеров различной природы; физическая интерпретация молекулярных механизмов влияния гидратной воды на параметры конформационной динамики белков и полипептидов;

Научная новизна. В данной работе впервые:

- предложена модель межмолекулярного электростатического взаимодействия, объясняющая появление медленной компоненты в корреляционной функции вращения белка как целого;
- проведено сравнение параметров внутренней динамики нескольких глобулярных белков в кристаллическом и аморфном состояниях в широком частотном диапазоне с помощью ЯМР-релаксационных методов;
- предложены две модификации эксперимента по измерению времени спин-решеточной ЯМР-релаксации во вращающейся системе координат в твердом теле, обусловленной гетероядерным диполь-дипольным взаимодействием, которые существенно расширяют частотный диапазон измерений и позволяют исключить нежелательный спин-спиновый вклад в релаксацию;
- применен метод твердотельной обменной ЯМР-спектроскопии с вращением под магическим углом для исследования молекулярной динамики биополимеров;
- проведен совместный количественный анализ температурно-частотных зависимостей времен протонной и углеродной магнитной релаксации в твердых биополимерах;
- предложен алгоритм совместного количественного анализа данных по ЯМР-релаксации и обменной спектроскопии;

Практическая значимость. Разработанные в данной диссертации методические подходы позволяют получать информацию о молекулярной динамике, недоступную с помощью применявшихся ранее рутинных методов. Эти подходы могут быть полезны во всех работах по исследованию природы молекулярных движений методом ЯМР, причем, не только биополимеров. Учет влияния межмолекулярных электростатических взаимодействий на вид корреляционной функции вращения белков в растворах имеет важное значение для корректного получения информации о внутренних движениях. Поскольку

релаксационные эксперименты в растворах белков в настоящее время очень распространены, полученные в диссертации результаты могут представлять интерес для очень большого числа исследователей. Интерес для работы многих исследовательских групп может иметь также полученный в диссертации результат по сравнению динамики белков в кристаллическом и аморфном состояниях. Данный результат является косвенным свидетельством того, что внутренняя динамика белков в твердом гидратированном состоянии и в растворе одинакова. Это очень важно для изучения биологической функциональности белков с помощью экспериментов на твердых препаратах белков.

Личный вклад соискателя. Диссертация является обобщением большей части исследований, которые соискатель выполнил за последние 15-20 лет. Все основные результаты и выводы диссертации были получены и сформулированы самим соискателем. Все ЯМР эксперименты, представленные в диссертации, и их анализ были проведены соискателем. В публикациях, в которых соискатель является первым автором, ему принадлежит основная роль в постановке задач и формулировке выводов. В остальных работах вклад соискателя заключался в основном в обсуждении результатов.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались лично автором на следующих научных конференциях:

- 10 Всесоюзная Конференция молодых ученых “Синтез и исследование биологически активных соединений” декабрь 1989, Рига;
- 5 Всесоюзное совещание ”Современные методы ЯМР и ЭПР в химии твердого тела”, Черногловка, июнь 1990;
- XXVIIth Congress AMPERE, Kazan, August 1994;
- The 29th AMPERE - 13th ISMAR Conference, Berlin, August, 1998;
- Field-Cycling NMR relaxometry Symposium, Berlin, August, 1998;
- III Всероссийская конференция “Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях”, Казань, апрель 2000;
- VII Всероссийская Конференция "Структура и динамика молекулярных систем", Яльчик, Марий-Эл, июнь 2000;

- International. Workshop “Modern development of magnetic resonance imaging and spectroscopy. Basics physics and application in medicine and biology.” Kazan, June 2001;
- European Conference on Solid State Nuclear Magnetic Resonance “New concepts and Applications”, Chamonix-Mont Blanc, France, September, 2001;
- 16th European Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, Prague, June 2002;
- IV Всероссийская конференция «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях», Казань, апрель 2005;
- XIII Международная Конференция «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение» Казань, апрель 2005.

Исследования, проводимые по теме диссертации были поддержаны инициативными грантами РФФИ №№ 94-04-12855, 95-04-12098, 95-04-12102, 96-04-49582, 98-04-48090, 01-04-49071 (в трех из них соискатель являлся руководителем), двумя совместными грантами РФФИ-ННИО (№№ 96-04-00106, 00-04-04007), грантом CRDF (№ RN1-417). Первый из основных результатов диссертации (см. заключительную часть автореферата) вошел в перечень важнейших результатов Российской Академии Наук в области естественных, технических, гуманитарных и общественных наук за 1997 год.

Публикации. По материалам диссертации было опубликовано 40 печатных работ, из которых 19 – статьи в рецензируемых журналах, из них 2 – заказные обзоры.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, трех глав, основных выводов и результатов, благодарностей, и списка цитируемой литературы (268 ссылок). Работа изложена на 247 страницах машинописного текста, содержит 76 схем и рисунков и 8 таблиц. Полный текст диссертации в электронном виде доступен по адресу

<http://www.kibb.knc.ru/person/krushelnitsky/DD/>

Основное содержание работы

Во **Введении** кратко изложены: роль молекулярной динамики в биологическом функционировании белков; общее описание физических подходов к исследованию биополимеров, в частности, методические особенности экспериментального изучения конформационной подвижности в твердом состоянии и растворе; структура диссертации вместе с кратким описанием основных задач, которые решались в процессе выполнения исследования.

ГЛАВА 1. ЯМР-методы исследования динамики белков и примеры их применения. Данная глава является обзорной. В ней описаны основные типы ЯМР экспериментов, дающих информацию о молекулярных движениях, и приведен литературный обзор наиболее значимых работ по исследованию динамики белков.

В разделе **1.1. Природные зонды, дающие информацию о молекулярной динамике посредством ядерного магнитного резонанса** перечислены основные ЯМР-зонды и соответствующие им типы ЯМР-экспериментов, которые используются при изучении молекулярной динамики биополимеров. В число этих зондов входят изотропный химический сдвиг, тензор анизотропии химического сдвига (АХС) и межъядерное диполь-дипольное взаимодействие. В разделах **1.2. Форма линии спектра ЯМР твердого тела, обусловленная анизотропией химического сдвига; 1.3. Вращение образца под магическим углом; 1.4. Двумерные обменные ЯМР-эксперименты; 1.5. Одномерные обменные ЯМР-эксперименты** дается детальное описание математического формализма экспериментов, использующих в качестве зонда для изучения молекулярной динамики анизотропию химического сдвига - анализа формы линии спектра статического и вращающегося под магическим углом (ВМУ) образца и обменной спектроскопии ЯМР. Особое внимание уделено описанию одномерной твердотельной обменной спектроскопии ЯМР с ВМУ. Методика одномерных обменных экспериментов была разработана в течение последних 10 лет, эти эксперименты еще не стали распространенными рутинными методами исследования молекулярной динамики. Количественный анализ данных по

обменной спектроскопии основывается на следующем схематическом выражении:

$$\text{Амплитуда} = \text{Функция} \left(\begin{array}{ll} \text{Экспериментальные} & \text{Молекулярные} \\ \text{параметры :} & \text{параметры :} \\ \omega_L - \text{резонансная частота} & \sigma - \text{тензор АХС} \\ \omega_R - \text{частота ВМУ} & N_S - \text{число возможных} \\ & \text{ориентаций тензора АХС} \\ t_1 - \text{период эволюции} & \alpha_i, \beta_i, \gamma_i, i = 1, N_S - \text{эйлеровы} \\ & \text{углы для всех ориентаций} \\ \tau_m - \text{время смешивания} & \mathbf{K} - \text{обменная матрица} \end{array} \right), \quad (1)$$

где модель молекулярного движения (реориентации тензора АХС) определяется эйлеровыми углами каждой из ориентаций (непрерывные распределения могут аппроксимироваться за счет большого N_S) и элементами обменной матрицы K_{ij} , которые определяют вероятность перескока тензора АХС из ориентации i в ориентацию j . Смысл обменных экспериментов состоит в том, чтобы, измеряя амплитуду линий в спектре ЯМР при различных экспериментальных параметрах, прежде всего при различных временах смешивания, с помощью ур-я (1) определить параметры, характеризующие молекулярную динамику. При этом конкретный вид *Функции* в ур-и (1) зависит от типа обменного эксперимента. В разделе 1.5 подробно описываются импульсные последовательности экспериментов trODESSA (Reichert et al., *J. Magn. Reson.* 125, 245, 1997) и CODEX (deAzevedo et al., *J. Chem. Phys.* 112, 8988, 2000), которые использовались в диссертации и приводится вид *Функции* в ур-и (1) для этих экспериментов.

В разделе 1.6 ЯМР-релаксация приводятся основные формулы, определяющие времена магнитной релаксации T_1 , T_2 и $T_{1\rho}$ как функции от спектральных плотностей движения. Поскольку в диссертации будет исследоваться релаксация только на ядрах ^1H , ^{13}C и ^{15}N , для которых в биополимерах определяющим механизмом релаксации является диполь-дипольное взаимодействие, другие механизмы не рассматриваются. Выражения для времен релаксации представлены для случаев как гомо-, так и гетероядерного дипольного взаимодействия. Раздел 1.7 Корреляционная функция

молекулярного движения и безмодельный подход посвящен описанию упоминавшегося выше безмодельного подхода – наиболее распространенного способа анализа времен магнитной релаксации в биополимерах. Основная идея этого подхода – разделение корреляционной функции внутреннего движения на усредняемую и неусредняемую части:

$$C(t) = S^2 + (1 - S^2) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (2)$$

где τ – время корреляции, характеризующее временной масштаб молекулярного движения, S^2 – параметр порядка, определяющий долю усреднения диполь-дипольного взаимодействия молекулярным движением. S^2 меняется от 0 до 1. При $S^2=0$ движение полностью усредняет межъядерное взаимодействие, что соответствует изотропному движению. $S^2=1$ означает отсутствие движения. В разделе **1.8 ЯМР и химический обмен в белковых растворах** описаны эксперименты, позволяющие изучать медленные конформационные движения в растворах за счет модуляции движением изотропного химического сдвига магнитных ядер. Эти эксперименты позволяют определять временной масштаб движения, но они в принципе не дают никакой информации о его геометрических параметрах. Раздел **1.9 Особенности проведения ЯМР-экспериментов на различных магнитных ядрах**. Рассматриваются методические особенности проведения экспериментов на магнитных ядрах, которые применяются в исследовании белков - ^1H , ^2H , ^{13}C и ^{15}N . Заключительный раздел первой главы **1.10 Конформационная динамика белков** посвящен обзору основных работ по исследованию динамики белков, как в растворе, так и (более подробно) в твердом состоянии. Кроме описания результатов различных исследований в их историческом развитии в этом разделе представлено обобщение основной информации о конформационной динамике белков, накопленной к настоящему времени, и методических проблем, возникающих при изучении динамики белков методом ЯМР.

ГЛАВА 2. Броуновская динамика и межмолекулярные электростатические взаимодействия белков в растворе. В разделе **2.1**

Качественная модель межмолекулярных электростатических взаимодействий на примере анализа концентрационной зависимости времен магнитной релаксации T_1 и T_2 протонов белка в растворе лизоцима (Рис. 1) показано, что корреляционная функция броуновского вращения белка как целого в неразбавленном растворе не может быть описана одной экспонентой. Анализ проводился с помощью стандартных выражений, определяющих времена релаксации:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{2}{3} \sigma' (J(\omega_0) + 4J(2\omega_0)), \quad (3)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{\sigma'}{3} (3J(0) + 5J(\omega_0) + 2J(2\omega_0)), \quad (4)$$

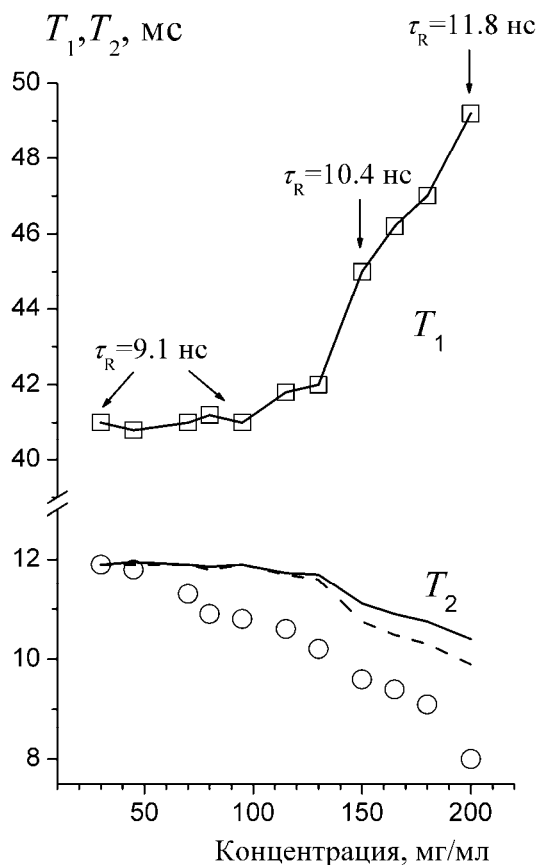


Рисунок 1. Концентрационная зависимость времен релаксации протонов белка в растворе лизоцима белка куриных яиц в D_2O (pH=3.0, $t=20^\circ C$, резонансная частота 27 МГц). Сплошная и пунктирная линии – рассчитанные величины времен релаксации T_2 , см. объяснения в тексте.

где σ' – усредненный второй момент протонов белка, $J(\omega)$ – спектральная плотность движения. Если предположить, что увеличение концентрации белка приводит к увеличению эффективной вязкости раствора и, соответственно, к увеличению времени корреляции броуновского вращения τ_R (величины τ_R , соответствующие различным значениям T_1 на концентрационной зависимости, показаны на Рис. 1), то тогда зависимость времени релаксации T_2 должна соответствовать сплошной линии на Рис. 1. Если же предположить, что увеличение концентрации приводит к увеличению доли димеров, то тогда зависимость T_2 должна соответствовать пунктирной линии. Таким образом, анализ данных показывает, что ни

то, ни другое предположение не соответствуют эксперименту.

Из Рис. 1 видно, что в диапазоне концентраций от 30 до 100 мг/мл T_1 практически не изменяется, а T_2 во всем диапазоне концентраций уменьшается при увеличении концентрации. Разница в поведении T_1 и T_2 может быть объяснена только тем, что в выражение для T_2 (4) входит спектральная плотность на нулевой частоте $J(0)$, которой нет в выражении для T_1 (3). Отсюда несложно сделать вывод о том, что при увеличении концентрации белкового раствора до определенного предела изменяется только спектральная плотность на нулевой частоте $J(0)$, в то время как $J(\omega_0)$ и $J(2\omega_0)$ практически не меняются. Отсюда можно сделать еще три вывода. Во-первых, кроме броуновского вращения со временем корреляции τ_R белок участвует еще в одном движении, время корреляции которого как минимум в несколько раз больше τ_R . Во-вторых, броуновское вращение с временем корреляции τ_R должно быть анизотропно, хотя бы в очень небольшой степени. В противном случае, медленное движение не могло бы быть зарегистрировано в принципе. В-третьих, увеличение концентрации раствора до некоторого значения приводит к изменению характеристик только этого медленного движения, оставляя все остальные параметры динамического состояния белка неизменными. Необходимо отметить, что существует несколько независимых экспериментальных свидетельств того, что корреляционная функция броуновского вращения белков в растворе содержит компоненту, имеющую незначительный относительный вес и время корреляции которой значительно превышает стандартное время τ_R .

Для физического объяснения такого вида корреляционной функции броуновского вращения белков нами была предложена следующая модель взаимодействия. Дипольный момент белка, который чаще всего имеет величину порядка нескольких сотен Дебай, взаимодействует с электрическим полем, создаваемым зарядами соседних белковых молекул, стараясь развернуться вдоль этого поля. Это создает анизотропию броуновского вращения белка. Однако внешнее электрическое поле не является постоянным, оно меняется как по величине, так и по направлению вследствие трансляционной диффузии белков

друг относительно друга. Исходя из этого, можно заключить, что относительный вес длинной компоненты корреляционной функции, т.е. степень анизотропии броуновского вращения, определяется силой межмолекулярного электростатического взаимодействия, а время корреляции этой компоненты, т.е. характерное время жизни этой анизотропии, определяется трансляционной диффузией белков. Легко показать, что характерное время трансляционной диффузии, которое можно определить как среднее время сдвига броуновской частицы на расстояние, равное собственному размеру, примерно на порядок величины превышает время корреляции вращательного движения. Это и объясняет большую разницу между временами корреляции двух компонент корреляционной функции вращения белков в растворе.

Следует отметить, что длинная компонента корреляционной функции может быть в принципе объяснена частичной олигомеризацией белков. Но этот механизм представляется гораздо менее вероятным. В этом случае должны образовываться кластеры, состоящие только из большого числа белков (порядка десяти), а число димеров и тримеров должно быть очень маленьким. Хотя такая олигомеризация действительно наблюдается в некоторых белках, но она имеет очень специфический характер, и она не может быть приписана ко всем белкам, в растворах которых наблюдалась длинная компонента корреляционной функции. Доказательством того, что олигомеризация не может служить причиной появления длинной компоненты, является также тот факт, что такой вид корреляционной функции наблюдался в релаксационных экспериментах ЯМР высокого разрешения на ядрах ^{13}C (Ribeiro et al., *JACS*, 102, 4040, 1980) и ^{15}N (Lee & Wand, *J. Biomol. NMR*, 13, 101, 1999). В спектрах высокого разрешения линии от олигомеров значительно уширены, потому они там попросту не видны.

В разделе **2.2 ЯМР-релаксационные эксперименты на протонах белков в растворах тяжелой воды** приводятся результаты анализа температурно-частотных зависимостей времен магнитной релаксации протонов белка в растворах нескольких белков при различных условиях. Пример такой зависимости показан на Рис. 2. Исходя из рассмотренной выше модели

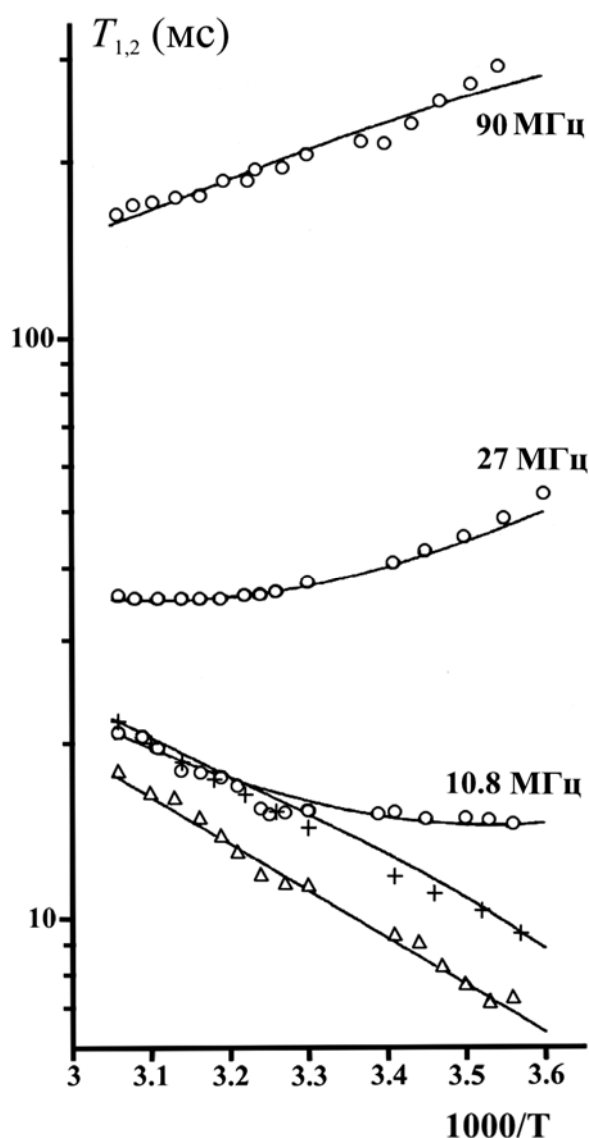


Рисунок 2. Температурные зависимости времен релаксации протонов белка в растворе лизоцима (рН 3.0, кон-я 45 мг/мл). Обозначения значков:

○ – T_1 (частота указана на рисунке)
 Δ – T_2 на 10.8 МГц
 + – T_2 на 27 МГц

электростатических взаимодействий белков в растворе, корреляционная функция броуновского вращения белка как целого записывается в виде:

$$C_R(t) = S_R^2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_S}\right) + (1 - S_R^2) \exp\left(-\frac{t}{\tau_R}\right), \quad (5)$$

где S_R^2 – параметр порядка обычного броуновского вращения белка, τ_S – время корреляции медленной компоненты корреляционной функции. Параметр S_R^2 определяет степень анизотропии броуновского вращения, которая вызвана межмолекулярным электростатическим взаимодействием. Можно показать, что из релаксационных измерений при не слишком низких резонансных частотах из эксперимента нельзя определить S_R^2 и τ_S отдельно, можно определить только произведение $S_R^2 \tau_S$. При обработке температурно-частотных зависимостей предполагалось, что все времена корреляции зависят от температуры по закону Аррениуса. Обработка данных

заключалась в компьютерной минимизации среднеквадратичного отклонения:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{T_{\text{exp}}^i - T_{\text{sim}}^i}{T_{\text{exp}}^i} \right)^2}, \quad (6)$$

где N – число экспериментально измеренных времен релаксации при всех температурах и резонансных частотах, T_{exp} и T_{sim} – экспериментальные и расчетные времена релаксации, соответственно.

Таблица 1. Микродинамические параметры, определенные из подгонки температурных зависимостей времен протонной релаксации на трех частотах резонанса. Времена корреляции соответствуют 20⁰ С. E_S и E_R – энергии активации медленного движения и броуновского вращения.

	E_S ккал/ моль	E_R ккал/ моль	$S_R^2 \tau_S$ нс	τ_R нс	Дип. мом. D
Лизоцим рН 3.0, 45 мг/мл	5.9	4.9	3.1	7.8	200
Лизоцим рН 3.0, 100 мг/мл	5.9	4.9	7.3	8	
Лизоцим рН 5.5, 45 мг/мл	5.9	4.9	9.5	7.6	
Рибонуклеаза А рН 2.7, 45 мг/мл	5.9	4.8	5.0	7.5	300
Рибонуклеаза А рН 6.5, 45 мг/мл	6	4.9	11.2	8	
Биназа рН 2.5, 50 мг/мл	5.5	5.2	4.5	7.0	170
Биназа рН 6.0, 50 мг/мл	5.5	6.5	9.5	10.2	
Триптофан- репрессор рН 6.0, 45 мг/мл	8.5	5.3	80	23.5	700
БСА рН 7.0, 50 мг/мл	5.0	4.8	55	38	450

Основные результаты анализа времен релаксации (Таб. 1) подтверждают предложенную выше модель межмолекулярных взаимодействий: изменение концентрации или рН белкового раствора приводят к изменению только параметров медленного движения, время корреляции броуновского вращения остается неизменным (исключением является биназа: увеличение рН приводит к частичной димеризации белка), а величина произведения $S_R^2 \tau_S$ явно коррелирует с величиной дипольного

момента белка. Необходимо отметить, что без включения в анализ длинной компоненты корреляционной функции вращения белка адекватного описания данных получить не удастся: в этом случае наблюдается увеличение амплитуды внутренних движений белка при повышении концентрации. Это не имеет физического смысла, поскольку увеличение концентрации раствора не может вызывать конформационных или денатурационных переходов в белке.

Кроме того, в разделе 2.2 с помощью измерений подробных зависимостей времен релаксации от рН и ионной силы в растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) показано, что большое значение для параметров медленного

движения имеет кулоновское отталкивание белков друг от друга. Все молекулы белка имеют одинаковый заряд, его увеличение из-за кулоновского отталкивания приводит к увеличению среднего расстояния между белками в растворе и, соответственно, к уменьшению силы их взаимного ориентирования.

В разделе **2.3 Анализ дисперсий времен релаксации воды в растворах белков** исследовалась корреляционная функция броуновского вращения лизоцима при различных концентрациях, pH и температурах методом измерения дисперсий (подробных частотных зависимостей в диапазоне резонансных частот от 10 кГц до 10 МГц) T_1 протонов воды. Данные эксперименты были проведены на установке с циклированием магнитного поля (Kimmich & Anzardo, *Prog. NMR Spectr.*, 44, 257, 2004). Принципиальная возможность исследования броуновского вращения белков с помощью экспериментов на протонах воды основана на том факте, что часть протонов воды связывается с глобулой белка (посредством химического обмена с лабильными протонами белка или за счет связывания молекул гидратной воды с белком) на достаточно долгое время и испытывает те же движения, что и белок. Пример дисперсий T_1 протонов воды представлен на Рис. 3. Результаты количественного анализа этих данных показали удовлетворительное соответствие с результатами экспериментов на протонах белка (см. выше). Допущение об одноэкспоненциальной корреляционной функции вращения белка ($S_R^2=0$) приводит к плохому описанию данных (пунктирные линии на Рис. 3). Главное преимущество анализа дисперсий T_1 в том, что они позволяют определить из эксперимента параметры S_R^2 и τ_S отдельно друг от друга. Анализ показал, что время корреляции τ_S имеет величину порядка 10^{-7} с, а параметр порядка S_R^2 составляет всего несколько процентов.

В разделе **2.4 Диэлектрические эксперименты в растворах миоглобина** представлены результаты исследования функции дипольной корреляции (ФДК) в растворах миоглобина методом временной диэлектрической спектроскопии (эксперименты проведены И.В. Ермолиной). Эти эксперименты наглядно демонстрируют неэкспоненциальность ФДК при увеличении концентрации белка (Рис. 4). Было показано, что с увеличением концентрации в растворе миоглобина

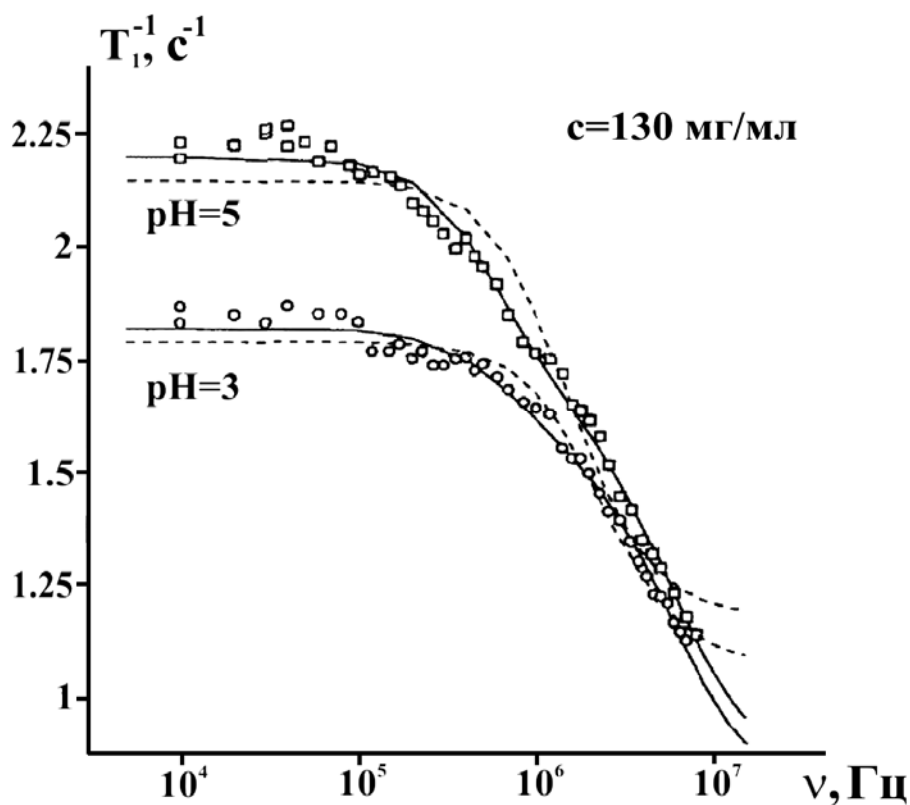


Рисунок 3. Дисперсии T_1^{-1} протонов воды в растворе лизоцима при 4^0 C при двух рН. Сплошные и штриховые линии – подгоночные кривые, соответствующие подгонкам при свободном параметре S_R^2 и при $S_R^2=0$, соответственно.

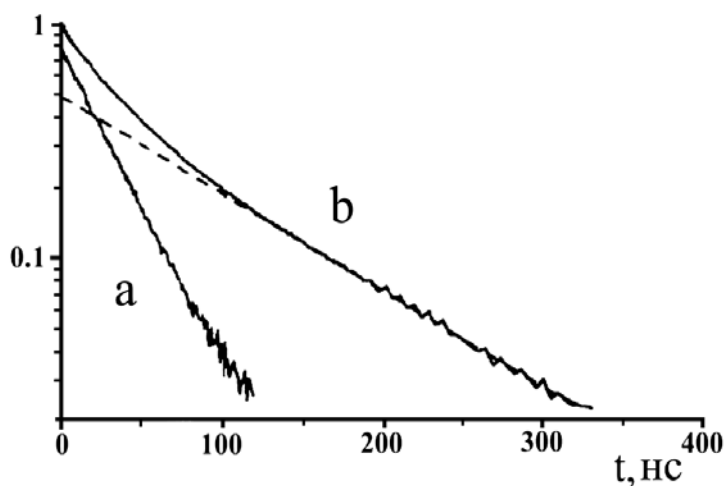


Рисунок 4. ФДК для раствора миоглобина при концентрации 50 (а) и 150 (б) мг/мл. Измерения проводились при $t=20^0\text{ C}$, рН=7. Штриховая линия обозначает длинную компоненту корреляционной функции.

изменяются параметры только медленного движения (увеличиваются S_R^2 и τ_S), в то время как остальные динамические параметры практически не изменяются. То, что диэлектрическая спектроскопия приводит к таким же результатам, что и ЯМР, свидетельствует о том, что длинная компонента корреляционной функции не является экспериментальным артефактом.

Раздел 2.5 Теоретические оценки энергии межмолекулярного электростатического взаимодействия белков и компьютерное моделирование броуновской динамики электрических диполей посвящен оценкам энергии взаимного электростатического взаимодействия белков в растворах и описанию результатов моделирования броуновской динамики белков при различных условиях (моделирование было проведено Е.А. Ермаковой). Белки представлялись в виде шаров с точечными электрическими диполями в центре. Результаты этого моделирования также наглядно демонстрируют появление длинной компоненты в корреляционной функции вращения белков при росте межмолекулярных электростатических взаимодействий.

В заключительном разделе **2.6** второй главы обобщаются основные результаты представленных экспериментов. Анализ множества независимых экспериментальных данных по ЯМР и диэлектрической спектроскопии показывает, что корреляционная функция броуновского вращения белков в неразбавленных растворах содержит компоненту со временем корреляции, превышающим время корреляции броуновского вращения белка как целого. Это означает, что броуновское вращение является анизотропным. Относительный вес этой компоненты в большинстве случаев очень мал, так что определить ее параметры можно только с помощью скрупулезного количественного анализа данных. Характеристики этой компоненты зависят от концентрации, pH и ионной силы белкового раствора. Отсюда можно сделать вывод, что причиной усложнения характера броуновского вращения белков являются межмолекулярные электростатические взаимодействия. Теоретические оценки энергии межмолекулярного электростатического взаимодействия в модели точечных диполей и зарядов при типичных значениях дипольных моментов белков и концентраций в несколько процентов показывают, что эта энергия сравнима по величине с энергией теплового движения. Компьютерное моделирование броуновской динамики частиц, обладающих электрическим дипольным моментом, подтвердило эффект появления длинной компоненты корреляционной функции.

Что касается внутримолекулярных движений, то эксперименты в растворе позволили получить только очень ограниченную информацию об их характеристиках. В растворе во временных масштабах больше, чем время корреляции броуновского вращения молекулы, усредняются до нуля многие из взаимодействий, посредством которых ЯМР позволяет получать информацию о динамике молекулы, прежде всего диполь-дипольные межъядерные взаимодействия и анизотропия химического сдвига. Это приводит к тому, что все внутренние движения со временами корреляции длиннее, чем время корреляции броуновского вращения, становятся практически невидимыми для ЯМР и других физических методов, регистрирующих реориентацию того или иного природного зонда. Детально изучать внутримолекулярные движения белков во всем частотном диапазоне можно только в твердом состоянии.

ГЛАВА 3. Исследование внутренних конформационных движений белков и полипептидов в твердом состоянии. Эта глава является наиболее объемной в диссертации. Большая часть результатов, представленных в данной главе, была получена в рамках совместной работы с коллегами из Университета Мартина Лютера (г. Халле, Германия). Раздел **3.1 Расширение частотного диапазона твердотельного ЯМР-эксперимента по релаксации во вращающейся системе координат для случая гетероядерной дипольной релаксации.** Измерение времени релаксации $T_{1\rho}$ - один из основных способов получения информации о молекулярной динамике в микросекундном диапазоне времен корреляции. Однако, как было показано Вандерхартом и Гарровеем (Vanderhart & Garroway, *J.Chem.Phys.*, 71, 2773, 1979), в жестких полимерах время $T_{1\rho}$ определяется в основном т.н. спин-спиновым вкладом в скорость релаксации, который появляется в результате релаксационного стока в решетку через дипольный резервуар протонов и который практически не зависит от параметров молекулярной динамики. Это существенно ограничивает возможности этого метода. В данном разделе представляются две модификации эксперимента по измерению $T_{1\rho}$ в твердых телах для случая релаксации ядер ^{13}C и ^{15}N , которая обусловлена гетероядерным дипольным взаимодействием с

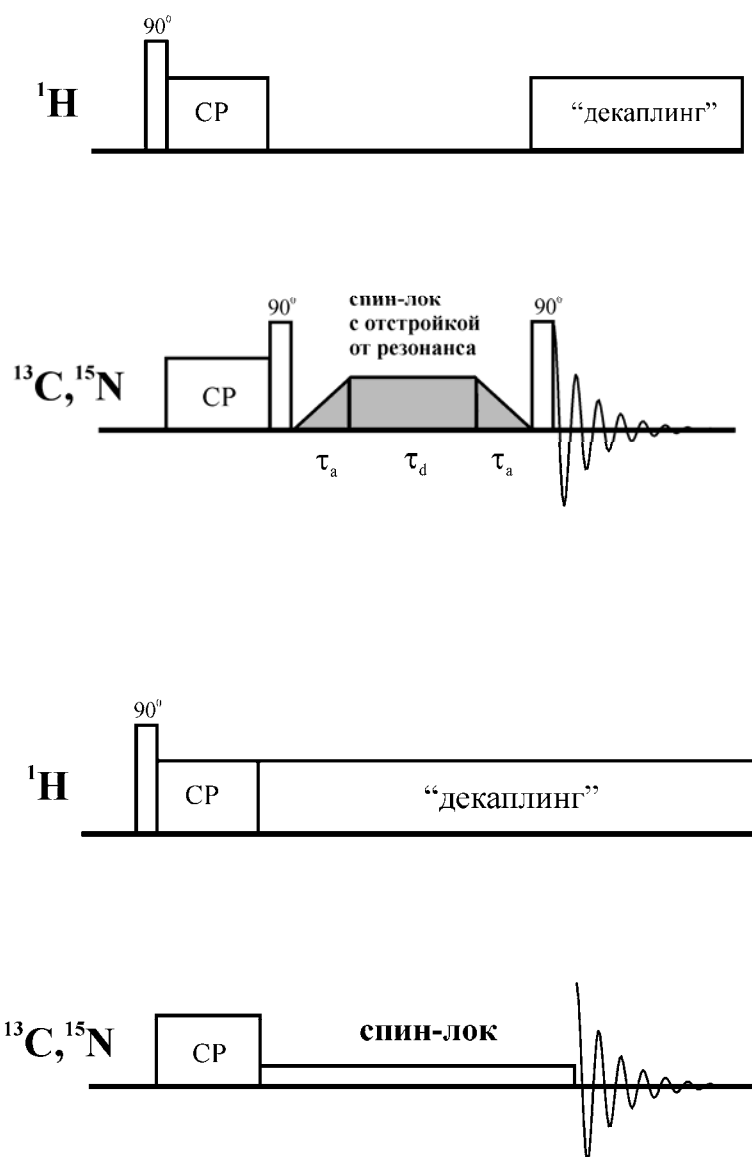


Рисунок 5. Импульсные последовательности для измерения $T_{1\rho}$ с отстройкой от резонанса поля спин-лока (вверху) и с дипольной развязкой от протонов (внизу). "CP" обозначает кросс-поляризационную секцию последовательности.

протонами. Смысл этих модификаций состоит в расширении частотного диапазона релаксационных измерений и избавлении от нежелательного спин-спинового вклада в скорость релаксации.

Для решения этой проблемы было предложено использовать 1) отстройку от резонанса частоты спин-лок поля и 2) дипольную развязку от протонов («декаплинг») во время действия спин-лок поля по ядрам углерода (азота). Импульсные последовательности этих двух модификаций эксперимента представлены на Рис. 5.

Первая модификация позволяет значительно (в несколько раз) увеличить амплитуду эффективного поля спин-лока без увеличения мощности передатчика за счет использования отстройки от резонанса частоты спин-лока. В этом случае эффективное поле будет равно:

$$B_{1e} = \sqrt{B_1^2 + (\Delta\omega/\gamma)^2}, \quad (7)$$

где $\Delta\omega/2\pi$ – отстройка от резонанса в частотных единицах, γ – гиромагнитное отношение магнитных ядер, B_1 – амплитуда спин-лок поля. Протонный «декаплинг» во второй модификации разрывает сток релаксации через

дипольный резервуар протонов, и это позволяет использовать очень низкие поля спин-лока, вплоть до сотен герц, в то время как в первой модификации поле спин-лока можно поднимать до 200-300 кГц (для ядер ^{13}C).

Время релаксации, измеренное с использованием отстройки от резонанса поля спин-лока, определяются следующим образом:

$$\frac{1}{T_{lp}^{off}} = \frac{1}{T_1} + \sin^2\theta \left[\frac{1}{T_{lp}^{\Delta}} - \frac{1}{2T_1} \right], \quad (8)$$

где

$$\frac{1}{T_1} = \frac{2\delta}{15} [J(\omega_S - \omega_I) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_S + \omega_I)], \quad (9a)$$

$$\frac{1}{T_{lp}^{\Delta}} = \frac{2\delta}{15} [2J(\omega_{le}) + 3J(\omega_S)], \quad (9b)$$

δ - константа диполь-дипольного взаимодействия ядер $^{15}\text{N}(^{13}\text{C})\text{-}^1\text{H}$, θ - угол между эффективным полем B_{le} и внешним постоянным полем B_0 ($\text{tg}\theta = B_1/(B_0 - 2\pi\nu/\gamma)$, ν - его частота), ω_{le} - круговая резонансная частота в наклоненной вращающейся системе координат. Выражения (8) и (9) были получены Р.Х. Курбановым.

Время релаксации, измеренное с использованием «декаплинга» во время действия спин-лока, определяется следующим феноменологическим выражением:

$$T_{lp}^{-1} = X_a \frac{4\delta}{15} \left(\frac{1}{6} J(\omega_1 + 2\omega_r) + \frac{1}{3} J(\omega_1 + \omega_r) + \frac{1}{3} J(\omega_1 - \omega_r) + \frac{1}{6} J(\omega_1 - 2\omega_r) \right), \quad (10)$$

где ω_r - круговая частота ВМУ, X_a - параметр, определяющий степень усреднения диполь-дипольного взаимодействия $^{15}\text{N}(^{13}\text{C})\text{-}^1\text{H}$ за счет «декаплинга». Данные модификации эксперимента были апробированы на простых модельных системах (глицин и диметилсульфон) на ядрах ^{13}C и ^{15}N . Эти модификации были использованы в следующих разделах третьей главы диссертации.

Раздел 3.2 Сравнение внутренней динамики белков в микрокристаллическом и гидратированном порошкообразном состояниях. Одна из основных проблем, возникающих при исследовании глобулярных белков в твердом состоянии, состоит в следующем: насколько влияют межбелковые контакты, которые отсутствуют в естественном для глобулярных белков водном

окружении, на структурные и динамические свойства белка? Иначе говоря, насколько правомочно применять информацию, полученную из твердотельных экспериментов, для объяснения молекулярно-биологических свойств белков, которые они проявляют в растворах? Что касается структуры, то уже достаточно давно было показано, что структуры одних и тех же белков, определенных рентгеноструктурным (твердое тело) и ЯМР (растворы) методами, за исключением отдельных специфических случаев одинаковы. Можно ожидать, что и динамика белков в двух состояниях тоже одинакова, однако явного и однозначного ответа на этот очень важный вопрос пока нет.

Для решения этой проблемы было предпринято систематическое сравнение внутренней динамики трех различных белков (лизоцим белка куриных яиц, лизоцим фага Т4 и барстар) в форме регидратированного лиофильно высушенного порошка и микрокристаллов (образцы микрокристаллов белков были приготовлены Ю.В.Гоголевым). Индикаторами молекулярной динамики были времена релаксации T_1 и T_{ρ}^{off} (см. 3.1) ядер ^{13}C естественного содержания. Эти времена релаксации чувствительны к молекулярной динамике в нано- и микросекундном диапазонах времен корреляции, соответственно. Широкий разброс химических сдвигов химически неэквивалентных углеродов позволяет проводить анализ динамики для основной и боковых цепей по отдельности.

В качестве примера на Рис. 6 представлены спектры ^{13}C естественного содержания куриного лизоцима в микрокристаллическом и порошкообразном состояниях. Можно видеть, что спектральное разрешение белка в микрокристаллическом состоянии несколько лучше чем в порошкообразном, что является следствием однородности микроокружения молекулы белка в кристалле. Для построения релаксационных спадов в спектрах белков были определены четыре спектральные полосы А-Д, по которым определялись интегральные интенсивности (площадь участка спектра) при различных релаксационных задержках. Полосу А составляют в основном метиновые (CH) альфа-углероды основной цепи, полосу В - метиленовые (CH₂) углероды боковых цепей, полосы

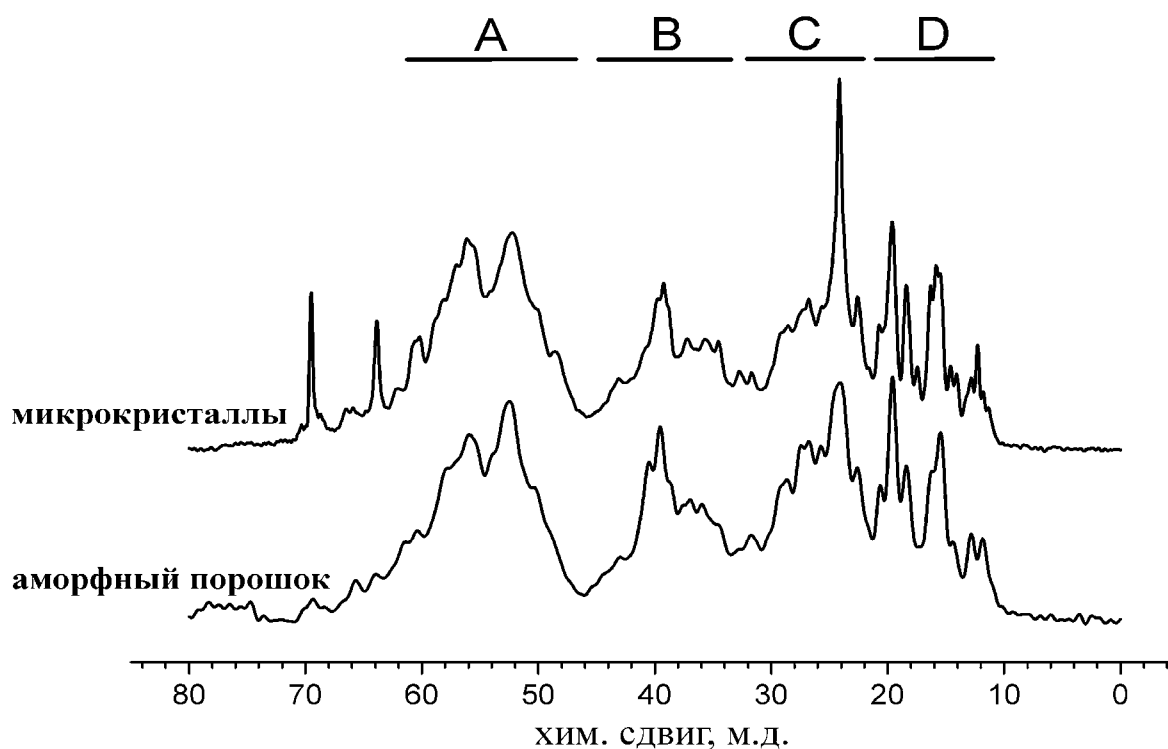


Рисунок 6. Спектры лизоцима белка куриных яиц при ВМУ и дипольной развязке от протонов. Резонансная частота 100.5 МГц, степень увлажнения порошка – 0.5 г воды на г сухого белка. Отрезки А-Д обозначают участки спектра, по которым строились релаксационные спады интегральных интенсивностей данных участков. Узкие линии при 71 и 65 м.д. в спектре микрокристаллов относятся к углеродам полиэтиленгликоля, который был составной частью кристаллизационного раствора.

С и D – метильные (CH_3) углероды с некоторой долей метиленовых углеродов в С полосе.

Релаксационные спады T_1 для трех белков и спектральных полос А и В представлены на Рис. 7. Визуальное сравнение этих спадов ясно показывает, что наносекундная динамика как основной, так и боковых цепей в кристаллическом и аморфном состояниях одинакова. Сравнение спадов $T_{1\rho}^{\text{off}}$ приводит к аналогичному выводу относительно динамики в микросекундной области. Из этого можно сделать вывод, что либо воздействие белок-белковых взаимодействий на внутреннюю конформационную динамику в аморфной и кристаллической фазах одинаково, либо это воздействие незначительно. Последнее представляется гораздо более вероятным и правдоподобным, поскольку геометрия межбелковых контактов и тип взаимодействия между соседними белками в этих двух типах образцов неодинаковы. Таким образом,

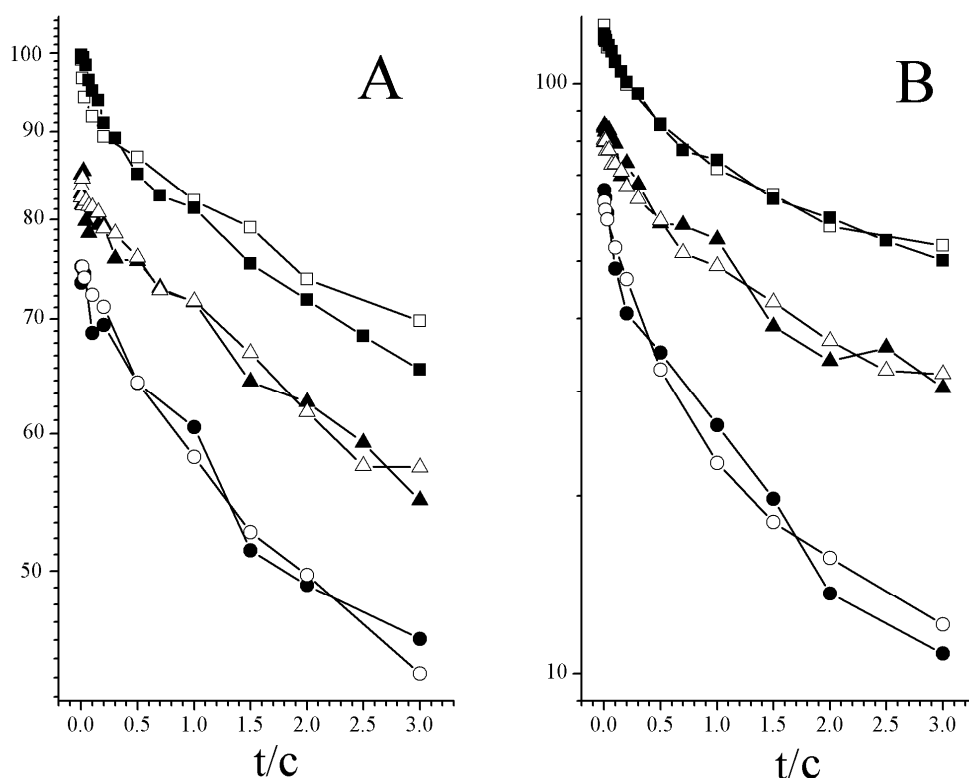


Рисунок 7. Релаксационные спады T_1 спектральных полос А и В. Закрашенные и незакрашенные значки обозначают микрокристаллические и аморфные образцы, соответственно. Обозначения символов:

- □ – куриный лизоцим (верхние кривые)
- ▲ △ – лизоцим Т4 (средние кривые)
- ○ – барстар (нижние кривые)

полученный результат является косвенным свидетельством того, что внутренняя динамика глобулярного белка в твердом состоянии и в растворе тоже одинакова, конечно, при условии, что в твердом состоянии белки полностью гидратированы и не образуют специфических белок-белковых комплексов. Справедливости ради необходимо заметить, что проведенные эксперименты по своей природе являются интегральными, и нельзя исключить, что в определенных ограниченных участках структуры белка межбелковые взаимодействия могут приводить к каким-то специфическим изменениям в динамике, но, в то же время, очевидно, что такие изменения, если и существуют, не носят глобального характера.

Представленные в разделе 3.2 эксперименты являются типичным примером качественно-сравнительного подхода к изучению молекулярной динамики. Хотя такие исследования могут ответить на некоторые важные вопросы, они не дают

никакого представления о параметрах и природе молекулярных движений. Для получения более детальной информации о динамике необходим количественный анализ широкого набора экспериментальных данных. Этому посвящена остальная часть третьей главы.

В разделе **3.3 Исследование динамики биополимеров с помощью ЯМР-релаксации на ядрах ^1H и ^{13}C естественного содержания** представлены результаты исследования внутренней динамики модельной системы, полилизина, и лизоцима белка куриных яиц в твердом (порошкообразном) состоянии при различных степенях увлажнения. Определение параметров внутренней динамики проводилось с помощью компьютерной минимизации (подгонки) квадратов отклонения (аналогично уравнению (6)). Подгонка проводилась по температурно-частотным зависимостям времен релаксации T_1 , $T_{1\rho}^{\text{off}}$ и $T_{1\rho}^d$ (см. **3.1**). Для каждого образца измерялось 15-25 времен релаксации, которые одновременно обрабатывались в процессе подгонки. Такой подход позволял определять динамические параметры в широкой частотной области достаточно точно и однозначно. Спектральная плотность движения в процессе подгонки записывалась в виде

$$J(\omega) = (1 - S^2) \cdot \frac{\beta}{\omega} \cdot \frac{(\omega\tau_0)^\beta}{1 + (\omega\tau_0)^{2\beta}}, \quad (11)$$

где τ_0 – время корреляции молекулярного движения, S^2 – упоминавшийся выше параметр порядка молекулярного движения (см. уравнение (2)), β – феноменологический параметр ширины распределения времен корреляции (ур-е (11) соответствует функции распределения Фуосса-Кирквуда). β изменяется от нуля (бесконечно широкое распределение) до единицы (функция распределения становится дельта-функцией). Введение распределения времен корреляции необходимо для адекватного описания экспериментальных данных: поскольку в полимерах характер движения может быть достаточно сложным, единственное время корреляции в большинстве случаев не может обеспечить удовлетворительного качества описания эксперимента. Допуская, что

температурная зависимость времени корреляции определяется законом Аррениуса, молекулярное движение может быть количественно описано набором из четырех микродинамических параметров: параметр порядка, время корреляции, параметр ширины распределения времен корреляции и энергия активации. Если межъядерный вектор участвует в двух типах молекулярного движения с сильно различающимися временами корреляции, спектральная плотность движения имеет вид:

$$J(\omega) = (1 - S_2^2) \cdot \frac{\beta_2}{\omega} \cdot \frac{(\omega\tau_2)^{\beta_2}}{1 + (\omega\tau_2)^{2\beta_2}} + S_2^2(1 - S_1^2) \cdot \frac{\beta_1}{\omega} \cdot \frac{(\omega\tau_1)^{\beta_1}}{1 + (\omega\tau_1)^{2\beta_1}}, \quad (12)$$

где нижние индексы параметров обозначают номер движения. При такой записи предполагается, что $\tau_1 \gg \tau_2$. Таким образом, четыре (для одного движения) или восемь (для двух движений) микродинамических параметров определяют весь набор времен релаксации, измеренных при различных резонансных частотах и температурах.

Параграф 3.3.1 *Полилизин – релаксация на ядрах ^{13}C естественного содержания*. Химическая структура полилизина представлена на Рис. 8. Он исследовался при четырех степенях увлажнения (от 0 до 0.2 г воды на грамм сухого полипептида) с помощью релаксационной ЯМР-спектроскопии на ядрах

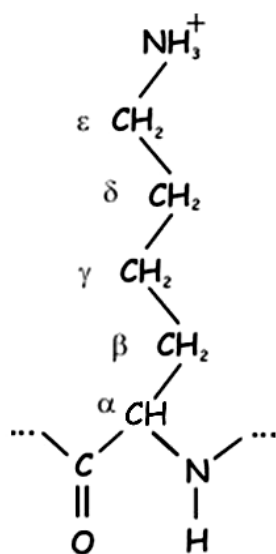


Рисунок 8.

Химическая структура полилизина.

^{13}C естественного содержания. В твердотельном спектре ЯМР разрешены линии от всех пяти алифатических углеродов этого полипептида, от альфа-углерода, находящегося на основной цепи до эпсилон-углерода, локализованного близко к концу боковой цепи. Это позволяет измерить времена релаксации для каждого углерода по отдельности и получить селективную динамическую информацию. Типичные примеры частотно-температурных зависимостей времен релаксации T_1 , $T_{1\rho}^{off}$ и $T_{1\rho}^d$ для отдельных углеродов при различных влажностях

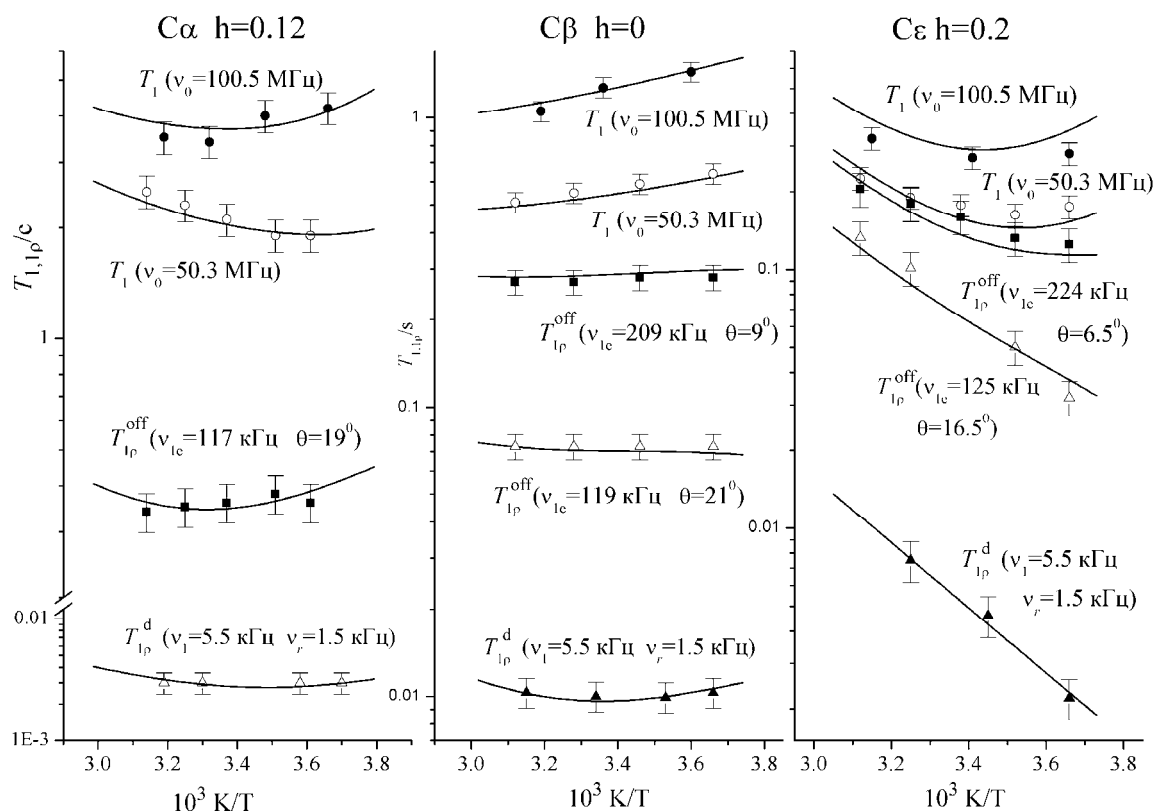


Рисунок 9. Примеры температурных зависимостей для различных углеродов и уровней гидратации (h обозначает уровень увлажнения полипептида). Сплошные линии - подгоночные кривые, построенные по параметрам, представленным на Рис. 10 и 11.

представлены на Рис. 9. Микродинамические параметры, определенные из анализа времен релаксации, представлены на Рис. 10 и 11.

Анализ показал - как основная, так и боковые цепи дегидратированного полилизина участвуют в двух типах молекулярных движений. Быстрое движение имеет время корреляции порядка нескольких наносекунд, относительно небольшую энергию активации и узкое распределение времен корреляции. Медленное движение имеет более высокую энергию активации и более широкое распределение времен корреляции. Время корреляции этого движения в сухом полипептиде имеет величину порядка 10^{-4} с как для основной, так и для боковых цепей.

Зависимость микродинамических параметров от степени гидратации для основной и боковых цепей совершенно различна. Время корреляции медленного движения основной цепи практически не изменяется во всем диапазоне исследованных уровней гидратации, а время корреляции медленного движения

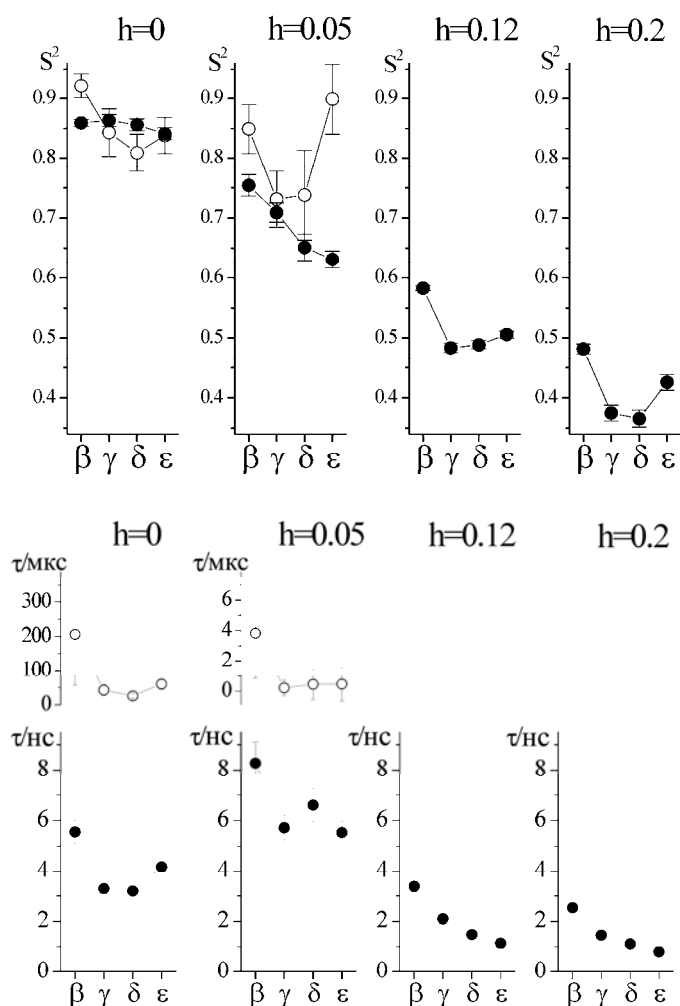


Рисунок 10а. Зависимости параметров порядка (вверху) и времен корреляции (внизу) от степени гидратации для четырех углеродов боковой цепи полилизина. Закрашенные и незакрашенные значки при уровнях гидратации 0 и 0.05 соответствуют параметрам быстрого и медленного движений.

боковых цепей уменьшается примерно на 5 порядков величины. При уровнях гидратации больше 10% быстрое и медленное движения экспериментально друг от друга неразличимы. Амплитуда медленного движения основной цепи увеличивается с ростом гидратации, но это увеличение незначительное, и даже при максимальном уровне гидратации амплитуда остается достаточно низкой. Амплитуда быстрого движения основной цепи не проявляет практически никакой зависимости от гидратации.

Отдельного комментария заслуживают абсолютные величины энергии активации медленного движения. Они являются слишком высокими, высота активационного барьера 100-150 кДж/моль не может соответствовать времени

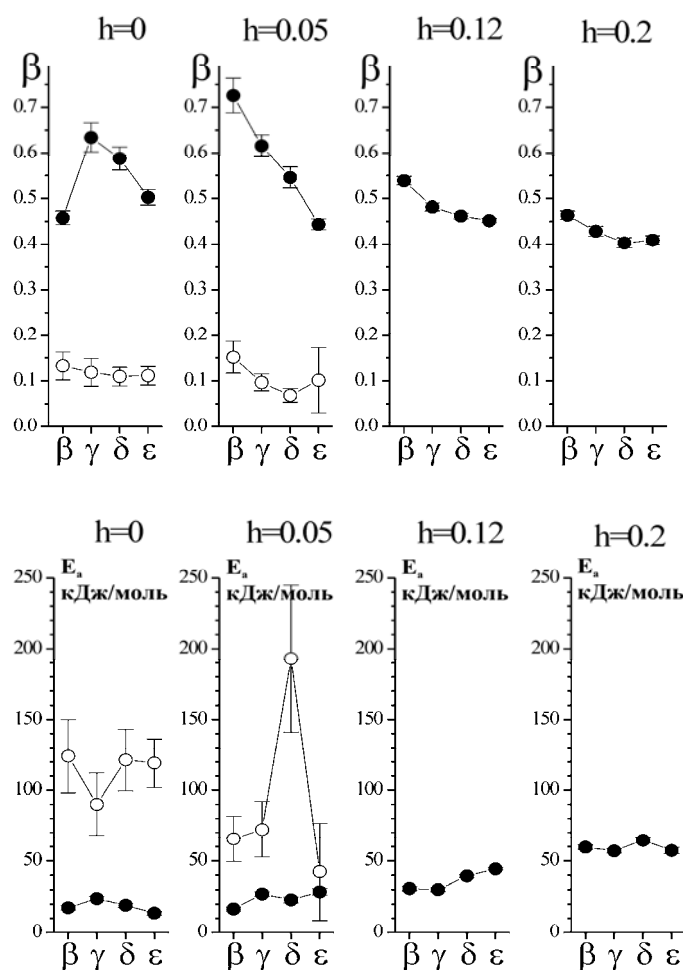


Рисунок 10b. Зависимости параметров ширины распределения (вверху) и энергии активации (внизу) от степени гидратации для четырех углеродов боковой цепи полилизина.

корреляции этого движения в микросекундном диапазоне при комнатной температуре (Рис. 10 и 11). Данное противоречие объясняется тем, что высота энергетических барьеров низкочастотных движений в полимерах имеет температурную зависимость (Слущер с соавт., *Физ. Тв. Тела*, 44, 1529, 2002; *Жур. Техн. Физики*, 72, 86, 2002). Это приводит к тому, что энергия активации, определенная по наклону температурной зависимости времени корреляции движения в относительно узком температурном диапазоне, является величиной кажущейся. Реальная энергия активации, оцененная по соотношению времени корреляции при комнатной температуре и при бесконечно высокой температуре ($10^{-12} - 10^{-13}$ с), имеет величину в пределах 35-50 кДж/моль (для сухого полипептида).

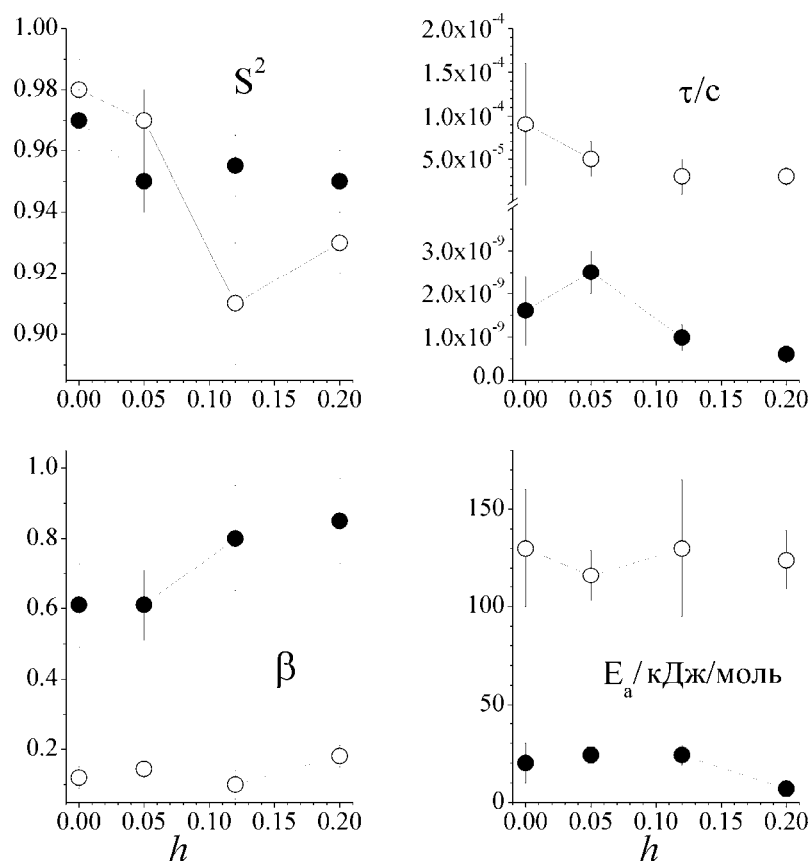


Рисунок 11. Микродинамические параметры, полученные из обработки релаксационных данных для альфа-углерода полилизина. Закрашенные и незакрашенные символы обозначают параметры быстрого и медленного движений, соответственно.

Все изменения в динамике полилизина, происходящие при увеличении уровня гидратации, не могут быть отнесены за счет гидратационно-зависимых конформационных переходов, поскольку при всех исследованных уровнях гидратации полилизин не меняет своей вторичной структуры, оставаясь преимущественно в конформации бета-слоя. Исходя из этого, объяснить различную гидратационную зависимость динамики основной и боковых цепей совсем не трудно. При всех уровнях гидратации основная цепь стабилизирована системой водородных связей, которая ограничивает ее движение вне зависимости от присутствия молекул воды. Что касается боковых цепей, то они, в отличие от нативной структуры глобулярных белков, не имеют строго определенной пространственной структуры. Это позволяет молекулам воды свободно проникать внутрь структуры полилизина и таким образом способствовать увеличению подвижности боковых цепей.

Отдельно следует отметить методическое значение представленных результатов. Большое количество экспериментальных параметров (времен релаксации), измеренных на одном и том же образце, позволило с привлечением минимального числа априорных допущений, во-первых, достаточно достоверно определить минимальное количество молекулярных движений, необходимых для адекватного описания всего набора экспериментальных данных и, во-вторых, количественно определить параметры этих движений. Без такого широкого набора данных детальное количественное исследование молекулярной динамики было бы невозможно.

В параграфе **3.3.2 Сравнительный анализ динамики полилизина и лизоцима по данным релаксации на ядрах ^{13}C естественного содержания** было проведено аналогичное полилизину исследование динамики глобулярного белка – яичного лизоцима в сухом и увлажненном до уровня 0.4 г воды на грамм белка состояниях. Основная цель данного исследования – проследить разницу во влиянии гидратации на конформационную динамику биополимеров различной природы и интерпретировать эту разницу с физической точки зрения. В случае лизоцима было, конечно, невозможно получить разрешение линий отдельных углеродов, как в полилизине, но, тем не менее, в спектре можно было различить линии CH , CH_2 и CH_3 углеродов, что позволяло характеризовать динамику основной и боковых цепей лизоцима по отдельности. Как и в полилизине, динамика всех углеродов описывалась двумя движениями, одно из которых имело времена корреляции порядка наносекунд, другое – доли миллисекунды. Но зависимости времен корреляции молекулярных движений от уровня гидратации в лизоциме не наблюдалось. Амплитуда движений с ростом гидратации увеличивалась, но не так, как в полилизине. При увлажнении подвижность боковых цепей сильнее увеличивается в полилизине, а основной цепи – в лизоциме. Эта разница в динамическом поведении объясняется различной природой этих двух биополимеров. С одной стороны, лизоцим имеет жесткую плотноупакованную структуру, внутрь которой молекулы воды свободно проникать не могут, а у полилизина такой структуры нет, и молекулы воды могут

свободно проникать между бета-слоями, создавая пространство для движения боковых цепей. Это объясняет разницу в подвижности боковых цепей двух биополимеров. С другой стороны, почти вся пептидная цепь полилизина включена в образование вторичной структуры (бета-слоя), а у лизоцима только 40% основной цепи образует альфа-спирали и бета-слои. Следствием этого является различная низкочастотная динамика основной цепи этих двух биополимеров: в полилизине амплитуда этого движения от гидратации почти не зависит, а в лизоциме зависимость достаточно сильная. Обобщая эти результаты, можно сказать, что механизм влияния гидратной воды на конформационную динамику биополимеров сводится к созданию свободного объема вокруг кинетической единицы, будь то отдельная боковая цепь или более объемный элемент структуры белка, например, альфа-спираль. Поскольку молекулы воды не имеют свободного доступа к гидрофобному ядру белка, подвижность боковых цепей белка возрастает только благодаря поверхностным эффектам. В то же время, если полипептидная цепь стабилизирована системой водородных связей, образующих вторичную структуру, то добавление воды и создание свободного объема уже роли не играет – цепь остается жесткой.

При всем обилии количественной информации, полученной о динамике полилизина и лизоцима с помощью релаксационной спектроскопии на ядрах ^{13}C , она имеет существенный недостаток, упоминавшийся выше: параметр порядка не дает представления о физической природе движения, поскольку переход от S^2 к конкретной модели движения неоднозначен. Эта проблема решается в параграфе **3.3.3 Полилизин – сравнительный анализ ЯМР-релаксации на ядрах ^1H и ^{13}C** . В дополнение к описанным выше углеродным экспериментам были проведены аналогичные релаксационные эксперименты на протонах при тех же степенях гидратации (увлажнение проводилось тяжелой водой). Времена протонной и углеродной магнитной релаксации определяются различными магнитными взаимодействиями, а именно межъядерными диполь-дипольными взаимодействиями ^1H - ^1H и ^{13}C - ^1H , соответственно. Таким образом, даже для одного и того же типа движения параметры порядка, определенные из протонных

и углеродных релаксационных экспериментов могут быть разными. Анализ данных показал, что в сухом полилизине для быстрого движения соблюдается неравенство $S_{\text{CH}}^2 > S_{\text{HH}}^2$, где S_{CH}^2 и S_{HH}^2 - параметры порядка, определенные соответственно из углеродного и протонного экспериментов. То есть, судя по протонным данным, амплитуда движения больше, чем это следует из анализа углеродных данных. А для медленного движения наблюдается обратное соотношение параметров порядка: $S_{\text{CH}}^2 < S_{\text{HH}}^2$. При анализе данных учитывалось следующее важное обстоятельство: в метильных и метиленовых группах расстояния С-Н и Н-Н равны соответственно 1.08 Å и 1.78 Å. В то же время, наиболее короткое расстояние между атомами разных химических групп примерно 2.3-2.5 Å. Величина диполь-дипольного взаимодействия обратно пропорциональна межъядерному расстоянию в шестой степени. Отсюда очень легко оценить, что релаксация углеродов практически полностью определяется взаимодействием с ковалентно связанными протонами одной и той же химической группы (СН, СН₂ или СН₃). А в случае протонов магнитная релаксация определяется взаимодействием между протонами не только одной и той же химической группы, но и между протонами различных химических групп, в том числе и весьма удаленных друг от друга по первичной последовательности. Кроме ЯМР экспериментов использовалось компьютерное моделирование Монте-Карло динамики полилизина, которое позволяло определять параметры порядка высокочастотного движения для углеродного и протонного релаксационного экспериментов, а также рассчитывать величину диполь-дипольного взаимодействия для протонов.

Анализ всех данных позволил получить следующую физическую картину молекулярной динамики этого полипептида. Как указывалось выше, полилизин имеет конформацию бета-слоя, при этом боковые цепи каждого бета-слоя были вставлены в промежутки между боковыми цепями противоположащего бета-слоя, как показано на Рис. 12. Вся молекулярная динамика полилизина является композицией из трех различных типов движения. Первый тип – это малоамплитудные колебания двугранных углов (степеней конформационной

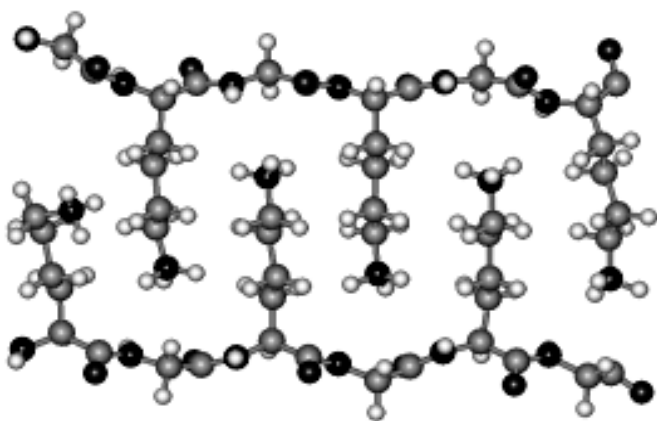


Рисунок 12. Часть молекулярной структуры, использованной в моделировании Монте-Карло: две цепи $(\text{Lys-Gly})_3$, принадлежащие двум противоположным бета-слоям. Поскольку боковые цепи соседних остатков полилизина ориентированы в разные стороны по отношению к плоскости бета-слоя, динамика тех боковых цепей, которые ориентированы наружу не анализировалась. Эти остатки были заменены на глицин для сокращения времени вычислений.

свободы полипептида) в пределах стерических ограничений, которые определяются плотностью молекулярной упаковки структуры полимера. Этот тип движения соответствует быстрому движению, которое наблюдалось в углеродных экспериментах, см. выше. Второй тип – редкие поворотно-изомерные конформационные скачки боковой цепи лизиновых остатков, которые изображены на Рис. 13. Характерное время этих скачков – микросекунды, они имеют высокую энергию активации, поскольку такие конформационные переходы связаны с преодолением высокого

энергетического барьера, вызванного стерическими ограничениями соседних лизиновых остатков.

Наконец, третий тип движения – это локальные увеличения расстояния

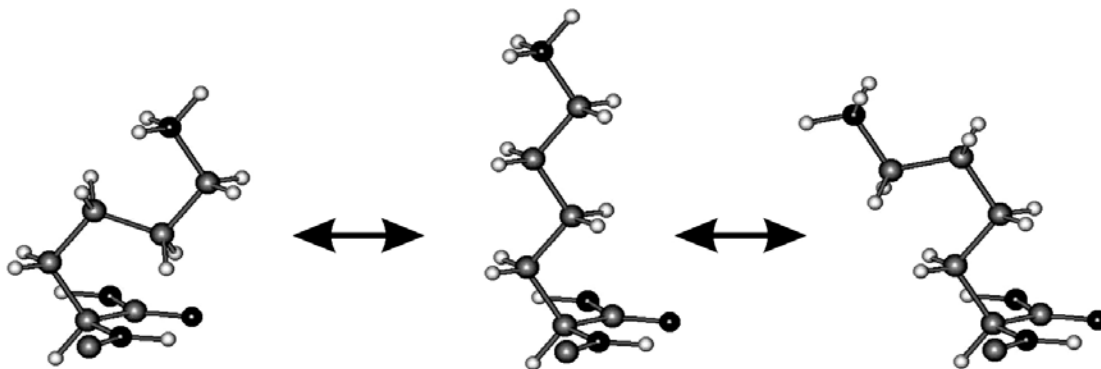


Рисунок 13. Переходы между конформациями «анти» и «син» боковой цепи полилизина,

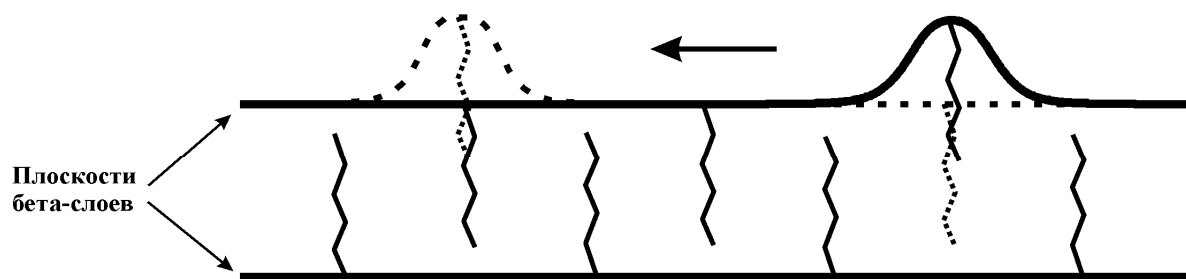


Рисунок 14. Схематическое изображение процесса диффузии дефектов вдоль основной цепи полилизиновой структуры, состоящей из параллельных бета-слоев.

между двумя противоположающимися бета-слоями, которые, скорее всего, диффундируют вдоль полипептидной цепи. Схематически этот тип движения изображен на Рис. 14. Модель этого движения (диффузия дефектов) была предложена в работе (Nusser et al., *J. Phys. Chem.*, 92, 6808, 1988) и использована нами для объяснения экспериментальных данных. Это движение имеет низкую энергию активации, поскольку оно не связано с преодолением высоких энергетических барьеров, и характерное время в наносекундном диапазоне. Важно отметить, что этот тип движения не виден напрямую в углеродных экспериментах, поскольку он приводит минимальным реориентациям С-Н векторов. В то же время, протонные эксперименты могут «почувствовать» этот тип движения, поскольку он приводит к усреднению диполь-дипольного взаимодействия между протонами, локализованными на боковых цепях лизиновых остатков противоположающихся бета-слоев. Таким образом, данная работа наглядно демонстрирует, что количественное сопоставление параметров порядка, определенных из релаксационных экспериментов на различных магнитных ядрах, может дать ясное представление о физической природе молекулярных движений, которое было бы недоступно в случае анализа экспериментальных данных только одного типа.

Раздел 3.4 Применение твердотельной обменной ЯМР-спектроскопии для исследования низкочастотной внутренней динамики белков. Мы были первыми в мире, кто применил твердотельную обменную ЯМР-спектроскопию

для исследования динамики биополимеров (Krushelnitsky et al., *J. Magn. Reson.* 138, 244, 1999). Параграф **3.4.1 Исследование динамики основной цепи барстара и полиглицина с помощью последовательности tr-ODESSA** излагает основные результаты этой работы. Была исследована динамика основной цепи барстара и полиглицина в сухом и увлажненном ($h=0.2$) виде. Эксперименты в барстаре проводились на ядрах ^{15}N (для чего белок был изотопно обогащен), в полиглицине – на ядрах ^{13}C естественного содержания. В обменных экспериментах была использована импульсная последовательность trODESSA. Одна из основных проблем, которая рассматривалась в данной работе, – влияние спиновой диффузии на получаемую из эксперимента информацию о молекулярном движении. В подобных экспериментах наблюдается одновременно два процесса – молекулярное движение и спиновая диффузия. При всей разнице в физике этих процессов, в обменном эксперименте они проявляются совершенно одинаково, и единственная экспериментальная возможность разделить их – проведение экспериментов при различных температурах. Время корреляции молекулярного движения от температуры зависит, а скорость спиновой диффузии – практически нет. Было теоретически показано, что молекулярное движение может проявиться в обменном спаде (зависимости интенсивности линии спектра от времени смешивания), только если время корреляции движения короче, чем характерное время спиновой диффузии. Именно поэтому в увлажненном барстаре наблюдалась зависимость формы обменного спада от температуры только при высоких температурах, а при низких температурах такой зависимости не было (Рис. 15). В сухом барстаре и полиглицине (в сухом и увлажненном виде) наблюдалась только спиновая диффузия.

Что касается молекулярного движения основной цепи барстара, его детальное исследование представлено в параграфе **3.4.2 Совместный анализ обменных и релаксационных ЯМР-данных – метод SREDA**. Для того, чтобы исключить нежелательное влияние спиновой диффузии, в этой работе использовался белок с 15% обогащением изотопом ^{15}N . Обменные эксперименты проводились с помощью импульсной последовательности CODEX. Основная

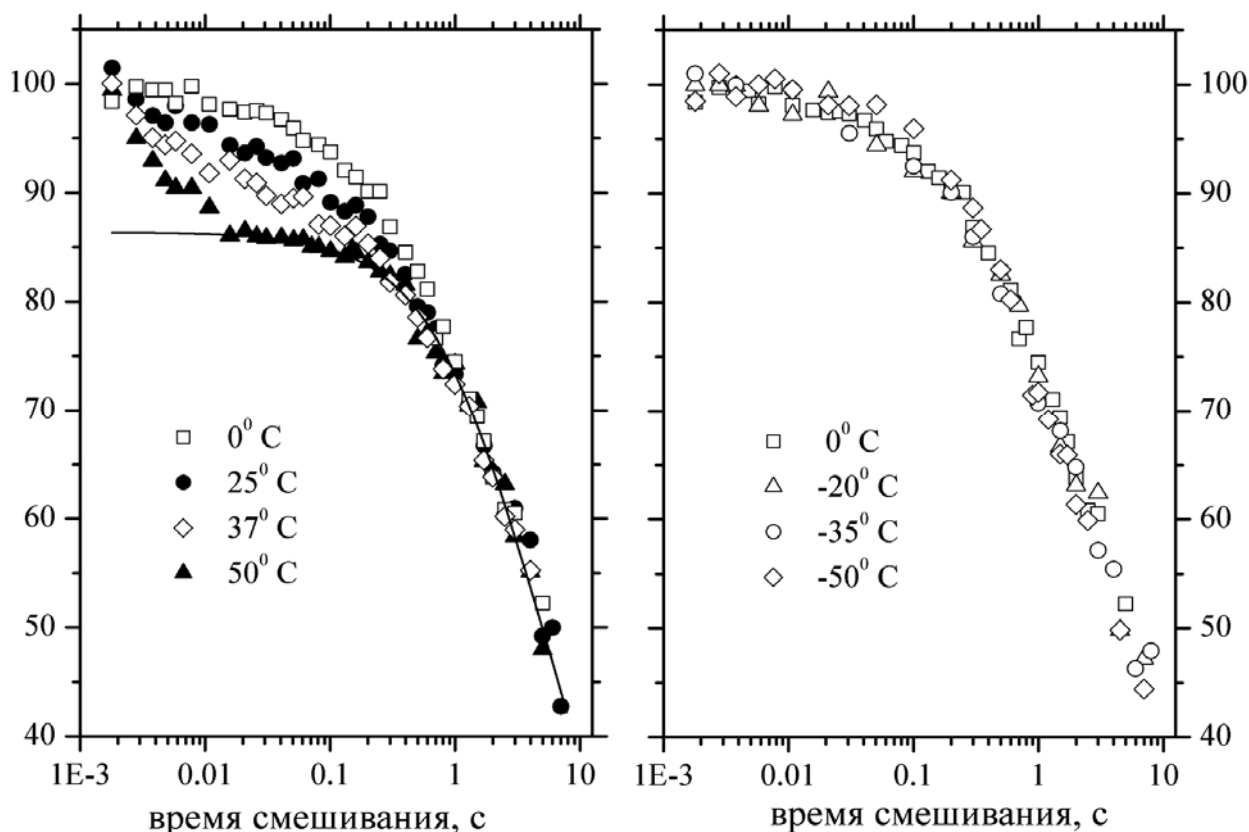


Рисунок 15. Нормализованные обменные спады для увлажненного ($h=0.2$) барстара при различных температурах.

цель этого исследования – количественное сопоставление параметров порядка, определенных из релаксационных и обменных данных ЯМР. Ядра ^{15}N на основной цепи белка представляют собой очень удобный объект для подобных экспериментов: магнитная релаксация определяется взаимодействием с единственным ковалентно связанным протоном, тензор АХС азотов близок к осевой симметрии, а направление главной оси этого тензора почти совпадает с химической связью N-H. Параметры порядка для релаксационного и обменного экспериментов определяются следующими выражениями:

$$S_{\text{relax}}^2 = \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \rho(\theta_1, \varphi_1) \rho(\theta_2, \varphi_2) \frac{3(\vec{n}(\theta_1, \varphi_1) \cdot \vec{n}(\theta_2, \varphi_2))^2 - 1}{2} d\varphi_1 d\theta_1 d\varphi_2 d\theta_2, \quad (13)$$

$$S_{\text{exch}}^2 = \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \rho(\theta_1, \varphi_1) \rho(\theta_2, \varphi_2) \frac{I(\theta_1, \varphi_1, \theta_2, \varphi_2)}{I(\theta_1, \varphi_1, \theta_1, \varphi_1)} d\varphi_1 d\theta_1 d\varphi_2 d\theta_2, \quad (14)$$

где $\rho(\theta, \varphi)$ - ориентационная функция распределения для N-H вектора (или главной оси тензора АХС), которая, собственно, определяет модель движения, θ и φ - углы полярной системы координат, $\vec{n}(\theta, \varphi)$ - единичный вектор с ориентацией, определяемой θ и φ , $I(\theta_1, \varphi_1, \theta_2, \varphi_2)$ – интенсивность сигнала в обменном эксперименте при условии, что до времени смешивания ориентация главной оси тензора АХС определялась углами θ_1 и φ_1 , а после – углами θ_2 и φ_2 . Интенсивность $I(\theta_1, \varphi_1, \theta_2, \varphi_2)$ определяется ур-ем (1) в форме, определяемой конкретным экспериментом, в предположении обмена только между двумя положениями. Допущение об осевой симметрии тензора АХС и совпадении главной оси тензора АХС и N-H вектора означает, что функция $\rho(\theta, \varphi)$ в ур-ях (13) и (14) одна и та же.

Хотя S_{relax}^2 и S_{exch}^2 определяются одной и той же функцией $\rho(\theta, \varphi)$, но определяются они по-разному. Следовательно, для разных $\rho(\theta, \varphi)$ соотношение параметров S_{relax}^2 и S_{exch}^2 будет различным. Это в свою очередь дает возможность селекции различных моделей движения непосредственно из эксперимента. Это является ключевой идеей данного методического подхода, которому была присвоена аббревиатура SREDA (Simultaneous Relaxation and Exchange Data Analysis). Возможности подхода SREDA были иллюстрированы модельными расчетами для четырех различных моделей движения, представленных в Таб. 2. Взаимозависимость параметров S_{relax}^2 и S_{exch}^2 для этих моделей движения при различных угловых амплитудах θ_a представлена на Рис. 16. Как видно, сопоставление S_{relax}^2 и S_{exch}^2 позволяет отличить одну модель движения от другой непосредственно из экспериментальных данных, хотя сделать это можно только для высокоамплитудных движений.

Этот метод был применен для анализа динамики основной цепи барстара в свободном и связанном с биназой состояниях. Кроме обменных спадов измерялись времена релаксации T_1 и $T_{1\rho}^{\text{off}}$ при нескольких температурах.

Таблица 2. Различные модели движения и соответствующие им ориентационные функции распределения. $\delta(x)$ обозначает дельта-функцию Дирака, θ_a обозначает угловую амплитуду для каждой модели.

Модель	Ориентационная функция распределения
a. Скачки между двумя равновероятными ориентациями	$\rho(\theta, \varphi) = \delta(\varphi)(0.5\delta(\theta) + 0.5\delta(\theta - \theta_a))$
b. Скачки между двумя ориентациями с населенностями 20% и 80%	$\rho(\theta, \varphi) = \delta(\varphi)(0.2\delta(\theta) + 0.8\delta(\theta - \theta_a))$
c. Диффузионные колебания внутри планарного угла (модель «веер»)	$\rho(\theta, \varphi) = \frac{\delta(\varphi)}{\theta_a} \quad \text{при } 0 < \theta < \theta_a$ $\rho(\theta, \varphi) = 0 \quad \text{при } \theta_a < \theta < \pi$
d. Диффузионные колебания внутри конуса	$\rho(\theta, \varphi) = \frac{\sin \theta}{2\pi(1 - \cos \theta_a)} \quad \text{при } 0 < \theta < \theta_a$ $\rho(\theta, \varphi) = 0 \quad \text{при } \theta_a < \theta < \pi$

Совместный количественный анализ релаксационных и обменных данных заключался в минимизации среднеквадратичного отклонения

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N_R + N_C} \left[\sum_{i=1}^{N_R} \left(\frac{T_{\text{exp}}^i - T_{\text{sim}}^i}{T_{\text{exp}}^i} \right)^2 + \sum_{i=1}^{N_C} \left(\frac{I_{\text{exp}}^{i*} - I_{\text{sim}}^i}{I_{\text{exp}}^{\text{max}*} - I_{\text{exp}}^{\text{min}*}} \right)^2 \right]}, \quad (15)$$

где N_R и N_C – число экспериментальных точек в релаксационных и обменных экспериментах, I_{exp}^* и I_{sim} – экспериментальные и теоретические интенсивности амплитуды линии спектра при различных временах смешивания в эксперименте CODEX; $I_{\text{exp}}^{\text{max}*}$ и $I_{\text{exp}}^{\text{min}*}$ – максимальная и минимальная экспериментальные интенсивности в обменном эксперименте. Времена релаксации определялись ур-ми (8) и (9), интенсивности амплитуды линии в обменном эксперименте определялись как

$$I(\tau_m) = S_{\text{exch}}^2 + (1 - S_{\text{exch}}^2) \int_0^\infty \rho\left(\frac{\tau}{\tau_0}\right) e^{\left(-\frac{\tau_m}{\tau}\right)} d\tau, \quad (16)$$

где $\rho(\tau/\tau_0)$ – функция распределения Фуосса-Кирквуда, τ_m – время смешивания.

Анализ данных показал, что основная цепь барстара участвует в двух типах молекулярных движений со временами корреляции 10^{-9} - 10^{-7} с и 10^{-4} - 10^{-3} с.

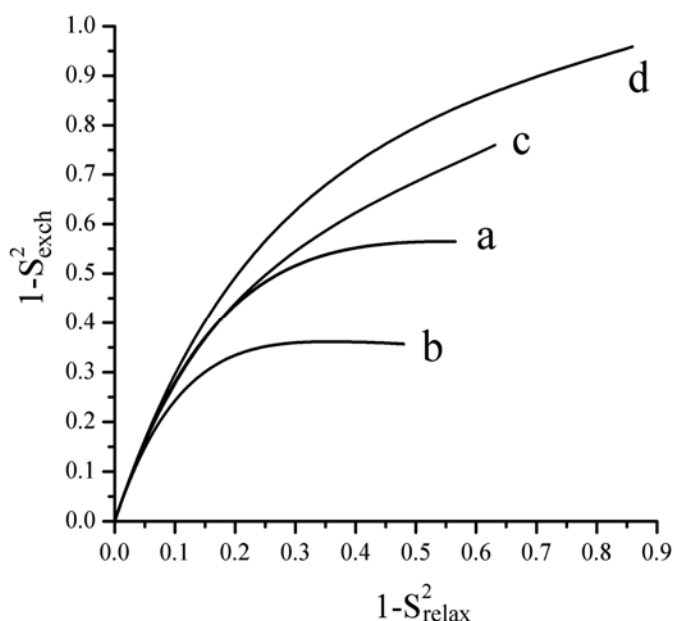


Рисунок 16. Взаимозависимость параметров S^2_{relax} и S^2_{exch} при различных угловых амплитудах движения для моделей **a-d** из Таб. 2. Расчеты S^2_{exch} были проведены при значениях скорости ВМУ 3 кГц, АХС $\Delta\sigma=160$ м.д., период эволюции в последовательности CODEX 0.333 мс, резонансная частота для ядер ^{15}N 40.5 МГц

Вычленение двух типов движения с такими временами корреляции довольно типично, оно хорошо согласуется и с нашими предыдущими, и со многими литературными данными. Связывание барстара с биназой ведет к уменьшению угловой амплитуды медленного движения основной цепи барстара в полтора раза. Это также приводит к значительному уменьшению амплитуды быстрого движения, хотя для наносекундных движений метод SREDA не может дать никаких количественных оценок, поскольку обменный эксперимент не чувствителен к динамике такого временного масштаба. Амплитуда

движения основной цепи белка очень небольшая (параметр порядка S^2_{relax} равен 0.87 ± 0.03 для свободного барстара и 0.94 ± 0.01 для комплекса барстар-биназа), поэтому определить модель реориентации из сопоставления S^2_{relax} и S^2_{exch} невозможно. Однако, исходя из угловой амплитуды движения, можно утверждать, что модель **d** (колебания в конусе) является наиболее реалистичной.

Параграф 3.4.3 Эффект зависимости скорости спиновой диффузии между ядрами ^{15}N от частоты ВМУ. Зависимость скорости спиновой диффузии между ядрами ^{15}N в тотально обогащенном белке от скорости ВМУ - хотя и достаточно частная, но методически важная проблема. Скорость спиновой диффузии определяется величиной диполь-дипольного межъядерного взаимодействия, которая может усредняться за счет ВМУ, если скорость ВМУ больше, чем межъядерное взаимодействие, выраженное в частотных единицах.

Нам удалось впервые измерить зависимость скорости спиновой диффузии между ядрами ^{15}N в тотально обогащенном белке от частоты ВМУ. Эксперименты были выполнены с помощью импульсной последовательности CODEX. Для сравнения аналогичные эксперименты были проведены в поликристаллическом ВОС-глицине, также обогащенном ^{15}N (Рис. 17). Спиновая диффузия – один из основных способов определения межъядерных расстояний в молекулах с помощью твердотельного ЯМР. С другой стороны, спиновая диффузия очень мешает при исследовании молекулярной динамики. Полученные результаты говорят о том, что в зависимости от цели эксперимента следует осознанно выбирать частоту ВМУ. Тем не менее, даже при самой высокой частоте ВМУ спиновая диффузия очень быстрая для спин-решеточной релаксации азотов белка (T_1 обычно имеет величину порядка десятков секунд). Это приводит к усреднению релаксационных спадов соседних ядер ^{15}N и, следовательно, к невозможности корректно извлечь селективную динамическую информацию. Это значит, что исследование динамики на отдельных магнитных ядрах с помощью измерения времени релаксации T_1 можно проводить только на селективно обогащенных белках.

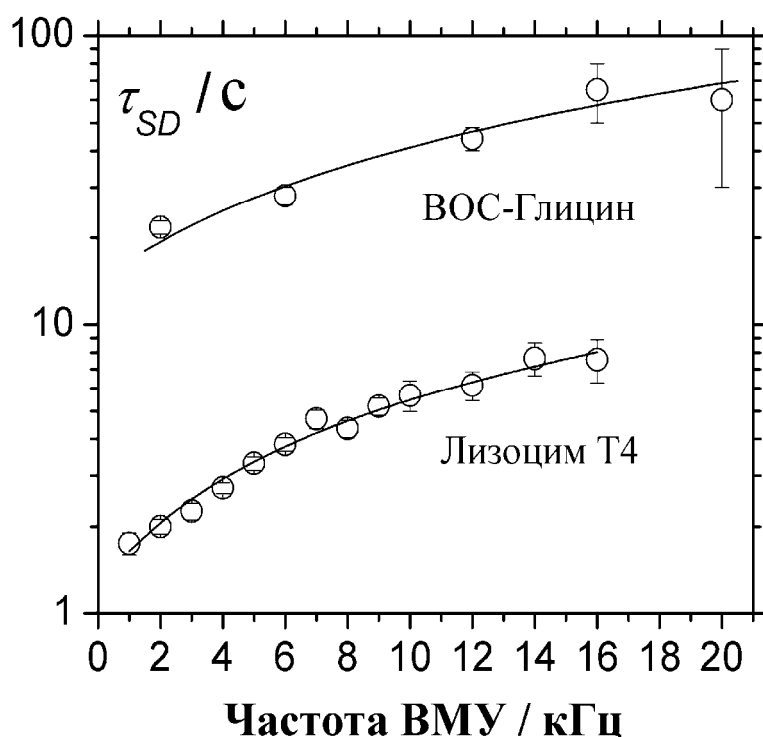


Рисунок 17. Зависимость характерного времени спиновой диффузии (τ_{SD}) от частоты ВМУ для ВОС-глицина и лизоцима Т4. Сплошные линии – описание экспериментальных данных линейными зависимостями.

Основные выводы и результаты

1. **Обнаружена анизотропия броуновского вращения глобулярных белков в водных растворах, вызываемая взаимным ориентированием белков за счет электростатических взаимодействий.**

Методами ЯМР-релаксации, диэлектрической спектроскопии и моделирования броуновской динамики обнаружена сложная форма корреляционной функции, свидетельствующая об анизотропии броуновского вращения белков. Параметры этой анизотропии различны для разных белков и зависят от концентрации, рН и ионной силы раствора. Для объяснения этого эффекта предложена модель броуновского движения белков, учитывающая взаимодействие электрического дипольного момента белка с электрическим полем, создаваемым ближайшими белковыми молекулами. Это взаимодействие вызывает анизотропию вращения, время жизни которой определяется трансляционной диффузией белков друг относительно друга. Данная модель позволяет на качественном уровне объяснить все наблюдаемые в эксперименте особенности броуновского вращения белков, вызываемые межмолекулярными взаимодействиями.

2. **Установлено, что внутренняя динамика глобулярных белков в кристаллическом и аморфном (регидратированный лиофильно высушенный порошок) состояниях в нано- и микросекундном диапазонах времен корреляции одинакова.**

С помощью измерения спин-решеточной релаксации в лабораторной и вращающейся системах координат на ядрах ^{13}C естественного содержания был проведен сравнительный анализ молекулярной динамики в нано- и микросекундном диапазонах времен корреляции для трех различных белков (лизоцим белка куриных яиц, лизоцим Т4 и барстар) в микрокристаллическом и гидратированном порошкообразном состояниях. Визуальное сравнение релаксационных спадов для всех трех белков показало, что внутренняя динамика как основной, так и боковых цепей в двух состояниях одинакова. Этот результат важен в связи с обсуждающимся в литературе вопросом о корректности применения твердотельных экспериментов для объяснения биологических свойств белка в растворе. Идентичность динамических параметров белка в порошке и кристалле говорит о том, что межбелковые взаимодействия, если белки не образуют специфических комплексов, не оказывают заметного влияния на внутреннюю динамику, в отличие от уровня гидратации, который имеет для белков большое значение. Данный результат является косвенным свидетельством того, что внутренняя динамика глобулярного белка в твердом гидратированном состоянии и в растворе тоже одинакова.

3. **Разработаны способы определения физических моделей молекулярной динамики, основанные на одновременном количественном анализе степеней усреднения различных магнитных взаимодействий.**

Одной из основных методических проблем исследования молекулярной динамики методом ЯМР является невозможность однозначного построения физической модели движения из определяемой в эксперименте степени усреднения (параметра порядка) того или иного магнитного взаимодействия. Эту проблему предложено решать путем сопоставления степеней усреднения различных взаимодействий, которые экспериментально измеряются на одном и том же образце. Такой сопоставительный количественный анализ данных ЯМР-экспериментов различного типа позволяет делать обоснованный выбор в пользу той или иной модели движения непосредственно из эксперимента. Данный подход был продемонстрирован двумя разными способами. В полилизине с помощью протонной и углеродной ЯМР-спектроскопии исследовалось движение межъядерных векторов ^1H - ^1H и ^1H - ^{13}C . Совместный анализ протонных и углеродных данных позволил констатировать наличие в полилизине трех различных динамических процессов и наглядно представить их физические модели. Другой способ реализации этого подхода заключается в одновременном проведении релаксационных и обменных экспериментов (подход SREDA), что позволяет сопоставлять движение межъядерного вектора и тензора анизотропии химического сдвига. Хотя данный метод позволяет определять модели только для высокоамплитудных движений, даже при низких амплитудах динамики совместный анализ обменных и релаксационных данных позволяет проводить гораздо более точную и однозначную количественную характеристику движений по сравнению с анализом этих данных по отдельности. Это было продемонстрировано при изучении динамики основной цепи барстера.

4. Установлено, что определяющую роль в молекулярном механизме влияния гидратации на внутреннюю конформационную динамику белков играет соотношение между стерической доступностью элементов структуры белка для молекул воды и наличием сети водородных связей, стабилизирующих вторичную структуру.

Данный вывод получен из сравнительного анализа гидратационной зависимости параметров внутренней динамики куриного лизоцима и полилизина, который был проведен с помощью релаксационной ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{13}C естественного содержания. Показано, что при увеличении гидратации полилизина значительно увеличивается подвижность боковых цепей, а подвижность основной цепи почти не изменяется. Важно отметить, что 80% основной цепи полилизина образует бета-слой и, следовательно, связано сетью водородных связей. Для лизоцима наблюдается обратная картина: плотная упаковка структуры не позволяет проникать молекулам воды внутрь структуры белка, и потому увеличение гидратации ведет только к слабому росту подвижности боковых цепей, в основном за счет поверхностных эффектов. А рост амплитуды низкочастотного движения основной

цепи, наоборот, по сравнению с полилизинном очень значителен. Причиной этой разницы является то, что только 40% основной цепи лизоцима образуют элементы вторичной структуры за счет образования сети водородных связей. Этот результат является шагом от феноменологического описания влияния гидратации на различные свойства белков к детальному анализу молекулярных механизмов этого влияния.

5. Разработаны две модификации ЯМР-эксперимента по измерению спин-решеточной релаксации во вращающейся системе координат в твердом теле, которые позволяют исключить нежелательный спин-спиновый вклад в релаксацию и существенно расширить частотный диапазон измерений.

Дополнительный т.н. спин-спиновый вклад в спин-решеточную релаксацию во вращающейся системе координат в твердых телах – принципиальное препятствие для широкого использования времен релаксации $T_{1\rho}$ в количественном исследовании молекулярной динамики жестких (био)полимеров. Для подавления этого вклада при измерении релаксации, обусловленной гетероядерным (в частности, ^{13}C - ^1H или ^{15}N - ^1H) диполь-дипольным взаимодействием, предложены две модификации традиционного эксперимента по измерению $T_{1\rho}$: 1) использование отстройки от резонанса поля спин-лока, что позволяет значительно увеличивать амплитуду спин-лока без увеличения мощности передатчика; 2) использование дипольной развязки от протонов во время действия спин-лока на частоте ядер ^{13}C или ^{15}N . Эти эксперименты были опробованы на модельных системах, и было показано, что они, во-первых, позволяют подавить спин-спиновый вклад в релаксацию и, во-вторых, существенно расширить частотный диапазон релаксационных измерений. Эти модификации явились основой для проведения последующих количественных исследований молекулярной динамики нескольких биополимеров.

6. Обнаружена зависимость скорости спиновой диффузии между ядрами ^{15}N от частоты вращения образца под магическим углом.

Эксперименты по измерению скорости спиновой диффузии между ядрами ^{15}N в тотально обогащенных белке (лизоцим T4) и поликристаллическом ВОС-глицине, проведенные с помощью одномерной обменной ЯМР-спектроскопии (импульсная последовательность CODEX) показали, что характерное время спиновой диффузии между ядрами ^{15}N линейно растет с ростом частоты ВМУ. Учет этого эффекта важен для осознанного выбора частоты ВМУ при проведении экспериментов, в которых спиновая диффузия может быть как полезным (структурные и корреляционные эксперименты), так и мешающим (динамические эксперименты) явлением. Определение абсолютных значений характерных времен спиновой диффузии в тотально обогащенном изотопом ^{15}N белке показало, что даже при самых высоких

экспериментально достижимых скоростях ВМУ спиновая диффузия быстрее, чем спин-решеточная релаксация большинства ядер ^{15}N основной цепи белка. Отсюда следует вывод о том, что получение селективной динамической информации с помощью измерения T_1 ядер ^{15}N в тотально обогащенном белке невозможно, для этого необходимо проводить селективное изотопное обогащение.

7. Экспериментально продемонстрирована возможность применения одномерной обменной ЯМР-спектроскопии твердого тела с ВМУ для исследования молекулярной динамики белков в миллисекундном диапазоне времен корреляции.

Одномерная твердотельная обменная ЯМР-спектроскопия была впервые применена для исследования параметров конформационной динамики основной цепи белка (барстара). Было показано, что обменный эксперимент (импульсная последовательность *tr-ODESSA*) способен детектировать движения в белке со временем корреляции порядка миллисекунды. В то же время, анализ данных существенно затрудняет спиновая диффузия, которая накладывается на обменный процесс, связанный с молекулярным движением. На основании анализа обменной схемы, включающей в себя молекулярное движение и спиновую диффузию, было продемонстрировано, что молекулярное движение не может наблюдаться, если оно медленнее, чем спиновая диффузия.

Автор выражает свою благодарность всем коллегам из Казанского Института Биохимии и Биофизики РАН, которые оказывали поддержку в проведении данных исследований. Автор также признателен коллегам из Университета Мартина Лютера (г. Халле, Германия, руководитель группы – профессор Хорст Шнайдер) за многолетнее сотрудничество и предоставление возможности проведения экспериментов на современных ЯМР-спектрометрах. Особая благодарность – профессору Владимиру Дмитриевичу Федотову, без участия которого эта работа не смогла бы состояться.

Список публикаций соискателя по теме диссертации.

Статьи в рецензируемых журналах

1. Fedotov, V. D. NMR and dielectric spectroscopy investigation of protein dynamic structure / V. D. Fedotov, Y. D. Feldman, A. G. Krushelnitsky, I. V. Ermolina // J. Mol. Struct. - 1990. - Vol. 219. - P. 293-298.
2. Крушельницкий, А.Г. Влияние электростатических межмолекулярных взаимодействий на броуновское вращение белков в растворе. / А. Г. Крушельницкий, В. Д. Федотов // Мол. Биол. - 1992. - Т. 26. - С. 424-431.
3. Krushelnitsky, A. G. Overall and internal protein dynamics in solution studied by the nonselective proton relaxation / A. G. Krushelnitsky, V. D. Fedotov // J. Biomol. Struct. Dyn. - 1993. - Vol. 11. - P. 121-141.

4. Ermolina, I. V. Investigation of molecular motions and interprotein interactions in solutions by NMR and TDDS / I. V. Ermolina, A. G. Krushelnitsky, I. N. Ivoylov, Y. D. Feldman, V. D. Fedotov // Appl. Magn. Reson. - 1993. - Vol. 5. - P. 265-283.
5. Файзуллин, Д. А. Исследование динамических свойств биназы в растворе методами водородного обмена и ^1H релаксации / Д. А. Файзуллин, Е. А. Ступишина, А. Г. Крушельницкий, В. Д. Федотов // Мол. Биол. - 1995. - Т. 29. - С. 563-573.
6. Крушельницкий, А. Г. Исследование динамики триптофан-репрессора в растворе методом неселективной протонной релаксации / А. Г. Крушельницкий // Мол. Биол. - 1996. - Т. 30. - С. 631-636.
7. Krushelnitsky, A. G. Dynamic structure of proteins in solid state. ^1H and ^{13}C NMR relaxation study / A. G. Krushelnitsky, V. D. Fedotov, J. Spevacek, J. Straka // J. Biomol. Struct. Dyn. - 1996. - Vol. 14. - P. 211-224.
8. Крушельницкий, А. Г. Исследование броуновской динамики бычьего сывороточного альбумина методом протонной релаксации / А. Г. Крушельницкий, Е. В. Юдина, В. Д. Федотов // Мол. Биол. - 1997. - Т. 31. - С. 293-299.
9. Krushelnitsky, A. Superslow backbone protein dynamics as studied by 1D solid-state MAS exchange NMR spectroscopy / A. Krushelnitsky, D. Reichert, G. Hempel, V. Fedotov, H. Schneider, L. Yagodina, A. Schulga // J. Magn. Reson. - 1999. - Vol. 138. - P. 244-255.
10. Krushelnitsky, A. G. Study of slow molecular motions in alpha-crystallin by proton magnetic spin-lattice relaxation in the doubly rotating frame / A. G. Krushelnitsky, A. E. Mefed, A. A. Kharitonov, V. D. Fedotov // Appl. Magn. Reson. - 2001. - Vol. 20. - P. 207-229.
11. Krushelnitsky, A. Expanding the frequency range of the solid-state $T_{1\rho}$ experiment for heteronuclear dipolar relaxation / A. Krushelnitsky, R. Kurbanov, D. Reichert, G. Hempel, H. Schneider, V. Fedotov // Solid State Nucl. Magn. Reson. - 2002. - Vol. 22. - P. 423-438.
12. Ermakova, E. Brownian dynamics simulation of electrostatically interacting proteins / E. Ermakova, A. G. Krushelnitsky, V. D. Fedotov // Mol. Phys. - 2002. - Vol. 100. - P. 2849-2855.
13. Krushelnitsky, A. G. Simultaneous processing of solid-state NMR relaxation and 1D-MAS exchange data: the backbone dynamics of free vs. binase-bound barstar / A. G. Krushelnitsky, G. Hempel, D. Reichert // Biochim. Biophys. Acta - 2003. - Vol. 1650. - P. 117-127.
14. Krushelnitsky, A. Hydration dependence of backbone and side chain polylysine dynamics: A C-13 solid-state NMR and IR spectroscopy study / A. Krushelnitsky, D. Faizullin, D. Reichert // Biopolymers - 2004. - Vol. 73. - P. 1-15.
15. Krushelnitsky, A. Response of lysozyme internal dynamics to hydration probed by C-13 and H-1 solid-state NMR relaxation / A. Krushelnitsky, D. Reichert // Appl. Magn. Reson. - 2004. - Vol. 27. - P. 501-518.
16. Krushelnitsky, A. Complex ^1H , ^{13}C NMR relaxation and computer simulation study of side-chain dynamics in solid polylysine / A. Krushelnitsky, D. Reichert // Biopolymers - 2005. - Vol. 78. - P. 129-139.

17. Крушельницкий, А.Г. Обменная ЯМР спектроскопия твердого тела: применение для изучения крупномасштабной конформационной динамики биополимеров / А.Г. Крушельницкий // Усп. Физ. Наук - 2005. - Т. 175. - С. 815-832.
18. Krushelnitsky, A. Solid-state NMR and protein dynamics / A. Krushelnitsky, D. Reichert // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectros. - 2005. - Vol. 47. - P. 1-25.
19. Krushelnitsky, A. Intermolecular electrostatic interactions and Brownian tumbling in protein solutions / A. Krushelnitsky // Phys. Chem. Chem. Phys. - 2006. - Vol. 8. - P. 2117-2128.
20. Krushelnitsky, A. ^{15}N spin diffusion rate in solid-state NMR of totally enriched proteins: the magic angle spinning frequency effect / A. Krushelnitsky, T. Bräuniger, D. Reichert // J. Magn. Reson. - 2006. - in press.
21. Krushelnitsky, A. Comparison of the internal dynamics of globular proteins in the microcrystalline and rehydrated lyophilized states / A. Krushelnitsky, Y. Gogolev, R. Golbik, F. Dahlquist, D. Reichert // Biochim. Biophys. Acta - 2006. - in press.

Статьи в сборниках и тезисы выступлений на конференциях

1. Крушельницкий, А.Г. Изучение внутренней динамики белков с помощью продольной и поперечной протонной релаксации / А.Г. Крушельницкий // Синтез и исследование биологически активных соединений: Тез. докл. 10-ой Всесоюз. конф. молодых ученых. - Рига, 1989. - С. 139.
2. Федотов, В.Д. Изучение внутренней динамики белков методом протонной релаксации в широкой частотной области // В.Д. Федотов, А.Г. Крушельницкий // Современные методы ЯМР и ЭПР в химии твердого тела: Тез. докл. 5-го Всесоюз. сов. - Черногоровка, 1990. - С. 181-182.
3. Faizullin, D.A. Dynamic properties of binase solutions as revealed by H-D exchange and H-NMR relaxation / D.A. Faizullin, E.A. Stupishina, A.G. Krushelnitsky // Congress AMPERE, 27th: Abstracts. - Kazan, 1994. - P. 771.
4. Krushelnitsky, A.G. The anisotropy of protein Brownian tumbling in solution as studied by the low field proton relaxation and time domain dielectric spectroscopy / A.G. Krushelnitsky, I.V. Ermolina, V.D. Fedotov // Congress AMPERE, 27th: Abstracts. - Kazan, 1994. - P. 899.
5. Ermolina, I.V. The use of TDDS for structural and dynamic investigations of protein molecules in solution / I.V. Ermolina, A.G. Krushelnitsky, I.N. Ivoylov, V.D. Fedotov // Dielectric and Related Phenomena: Abstracts of the Int. Conf. - Zakopane, Poland, 1994.
6. Ermolina, I.V. Investigation of molecular motion and interprotein interactions in solutions by TDDS and ^1H NMR / I.V. Ermolina, A.G. Krushelnitsky, I.N. Ivoylov, I.V. Nesmelova, V.D. Fedotov // Biophys. J. - 1995. - 68, № 2. A343. - Abstracts of the 39th Ann. Meeting of the Biophysical Society, 12-16 February 1995, San-Francisco.
7. Fedotov, V.D. ^1H and ^{13}C nuclear magnetic relaxation and the effects of dehydration on local dynamics in solid proteins / V.D. Fedotov, A.G. Krushelnitsky, J. Spevacek, J. Straka // NMR in Molecular Biology: Abstracts of the Int. Conf. - Wildbad-Kreuth, Germany, 1995. - P16.

8. Faizullin, D.A. Enzyme dynamics in the range of catalytic activity / D.A. Faizullin, E.A. Stupishina, A.G. Krushelnitsky, V.D. Fedotov // International Conference on Molecular Structural Biology: Proc. - Vienna, 1995. - P. 236.
9. Fedotov, V.D. The effect of the internal protein dynamics on the enzymatic reaction rate / V.D. Fedotov, A.G. Krushelnitsky // Karadeniz J. Med. Sci. – 1995, Vol. 8. - P. 199-200. - Abstracts of the Euroasian Symposium on Current Trends in Biotechnology: Gene Diagnostics, Gene Therapy and Informational Immunity. 29 Oct.- 6 Nov., 1995, Ankara, Turkey.
10. Krushelnitsky, A. Superslow backbone protein and polypeptide dynamics as studied by solid state MAS exchange NMR spectroscopy / A. Krushelnitsky, D. Reichert, V. Fedotov, H. Schneider // AMPERE 29th – ISMAR 13th International Conference: Proc. - Berlin, 1998. - P. 466-467.
11. Krushelnitsky, A. NMR relaxation in doubly rotating frame as a tool for studying slow protein dynamics / A. Krushelnitsky, D. Markov, A. Kharitonov, A. Mefed, V. Fedotov // Field-Cycling NMR relaxometry Symposium: Proc. - Berlin, 1998. - P. 20-21.
12. Fedotov, V.D. The study of protein and polypeptide dynamics by solid state NMR relaxation methods / V.D. Fedotov, A.G. Krushelnitsky, L.O. Yagodina, D. Reichert, H. Schneider, A.E. Mefed, J. Spevacek // Molecular mobility and order in polymer systems: Proc. of the 3rd Int. Symp., St. Petersburg, 1999. - P-002.
13. Ermakova, E.A. Brownian dynamics simulation of electrostatically interacting proteins / E.A. Ermakova, A.G. Krushelnitsky, V.D. Fedotov // Molecular mobility and order in polymer systems: Proc. of the 3rd Int. Symp. - St. Petersburg, 1999. - P-034.
14. Ермакова, Е.А. Исследование броуновской динамики в концентрированных белковых растворах методом компьютерного моделирования / Е.А. Ермакова, А.Г. Крушельницкий, В.Д. Федотов // Структура и динамика молекулярных систем: Сб. статей 6-ой Всерос. конф. - Казань; Йошкар-Ола, 1999. - С. 370-373.
15. Мефед, А.Е. Протонная магнитная релаксация в дважды вращающейся системе координат и медленная молекулярная динамика белков / А.Е. Мефед, А.Г. Крушельницкий, А.А. Харитонов, В.Д. Федотов // Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях: Тез. докл. 3-ей Всерос. конф. - Казань, 2000. - С. 22.
16. Крушельницкий, А.Г. Исследование медленных молекулярных движений глобулярных белков методом протонной магнитной релаксации в дважды вращающейся системе координат / А.Г. Крушельницкий, А.Е. Мефед, А.А. Харитонов, В.Д. Федотов // Структура и динамика молекулярных систем: Тез. докл. 7-ой Всерос. конф. – Казань; Йошкар-Ола, 2000. - С. 54-55.
17. Крушельницкий, А.Г. Исследование медленных молекулярных движений глобулярных белков методом протонной магнитной релаксации в дважды вращающейся системе координат / А.Г. Крушельницкий, А.Е. Мефед, А.А. Харитонов, В.Д. Федотов // Структура и динамика молекулярных систем: Сб. статей 7-ой Всерос. конф. – Казань; Йошкар-Ола, 2000. - С. 206-209.

18. Krushelnitsky, A. Expanding frequency range of the solid state $T_{1\rho}$ experiment for heteronuclear dipolar relaxation / A. Krushelnitsky, R. Kurbanov, D. Reichert, G. Hempel, H. Schneider, V. Fedotov // Modern development of magnetic resonance imaging and spectroscopy. Basics physics and application in medicine and biology: Proc. International Workshop. - Kazan, 2001. - P. 66.
19. Krushelnitsky, A. Expanding frequency range of the solid state $T_{1\rho}$ experiment for heteronuclear dipolar relaxation / A. Krushelnitsky, R. Kurbanov, D. Reichert, G. Hempel, H. Schneider, V. Fedotov // European Conference on Solid State Nuclear Magnetic Resonance. New concepts and Applications: Abstracts. - Chamonix-Mont Blanc, France, 2001. - P. 60.
20. Krushelnitsky, A. NMR relaxation and 1D MAS exchange study of backbone protein dynamics in solid state / A. Krushelnitsky, D. Reichert, G. Hempel, H. Schneider, V. Fedotov // European Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference; 16th: Abstracts. - Prague, 2002. - PA48.
21. Крушельницкий, А.Г. Современные методы ЯМР твердого тела и конформационная динамика белков / А.Г. Крушельницкий // Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях: Тез. докл. 6-ой Всерос. конф. - Казань, 2005. - С. 18.